

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JULIANE LOPES DA ROCHA

CARACTERIZAÇÃO DE PROTEÍNAS HIPOTÉTICAS CONSERVADAS DO
***Trypanosoma cruzi* (CHAGAS, 1909)**

CURITIBA

2008

JULIANE LOPES DA ROCHA

**CARACTERIZAÇÃO DE PROTEÍNAS HIPOTÉTICAS CONSERVADAS DO
Trypanosoma cruzi (CHAGAS, 1909)**

Monografia apresentada à disciplina Estágio em Genética do curso de graduação em Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do grau de bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador Interno: Prof. Dr. Ricardo Lehtonen
Rodrigues de Souza

Orientadora Externa: Dra. Daniela Parada
Pavoni

CURITIBA

2008

“A percepção do desconhecido é a mais fascinante das experiências. O homem que não tem os olhos abertos para o misterioso passará pela vida sem ver nada.”

Albert Einstein

Dedico este trabalho a todos os que me apoiaram, incentivaram e acreditaram que eu seria capaz, em especial à minha família e aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram para que este trabalho fosse realizado.

A toda equipe do Instituto de Biologia Molecular do Paraná, em especial ao Felipe, Fernando e Didi, que contribuíram diretamente para a realização deste trabalho e a todos que ofereceram contribuições variadas, desde o ensino de técnicas, teorias, auxílios diversos, preparos de reagentes e materiais, até o apoio emocional que foi importante em diversos momentos e culminou com a formação de novas amizades.

À minha orientadora do IBMP, Dra. Daniela Pavoni, pela dedicação, paciência e confiança depositadas em mim, mesmo sabendo que era a primeira vez que eu entrava em um laboratório de Biologia Molecular, e por isso teria muito a aprender. E ao meu orientador da UFPR, Dr. Ricardo Lehtonen, que prontamente aceitou o convite de ser meu orientador interno, fazendo a minha ligação com a Universidade.

A todos os colegas de curso, que me acompanharam durante esses quatro anos (ou um pouco menos, pois os calouros eu só conheci depois) e que posso chamá-los de amigos. Posso responsabilizá-los por ter feito possível a minha caminhada durante a faculdade. Sem a presença deles, esta caminhada teria sido muito mais difícil e tortuosa, e possivelmente não teria o mesmo valor que tem hoje. Foram importantes em diversos momentos, desde a hora de estudar para uma prova até a hora de oferecer um ombro amigo para chorar, um abraço afetuoso nos momentos difíceis ou mesmo um abraço carinhoso simplesmente para dizer: eu gosto de você!

Às minhas amigas de mais de década, apesar de morarem a mais de 500 km de distância, continuam presentes em minha vida e sei que continuarão presentes eternamente. Isa e Lali, só tenho a agradecer: obrigada por serem minhas amigas!

Aos meus colegas de sábado à noite, que sempre encontro no Forró Calamengau e são responsáveis pela diversão e distração. Mesmo quando tenho mil compromissos com a data vencendo, eles conseguem fazer com que eu esqueça os meus problemas e me distraia por alguns momentos, aliviando o estresse, a ansiedade e a tensão. É com muito carinho que agradeço a diversão proporcionada!

À minha família, pela condição de vida e pela oportunidade proporcionadas, por satisfazerem minhas necessidades e, muitas vezes até mesmo as minhas futilidades. E, principalmente, por agüentarem minhas crises nervosas, causadas pela combinação de minha personalidade com os estresses causados pelos estudos e trabalhos.

A todos vocês, muito obrigada!

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - CICLO DE VIDA DO <i>T. cruzi</i>	16
FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PROCESSO DE PCR.....	25
FIGURA 3 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PROCESSO DE CLONAGEM EM pENTR™/D-TOPO®.....	27
FIGURA 4 - MAPA DO VETOR pENTR™/D-TOPO®.....	28
FIGURA 5 - MAPA DO VETOR pDEST™17.....	32
FIGURA 6 - DESENHO ESQUEMÁTICO DO VETOR pTcPR-HisN.....	46
FIGURA 7 - GEL DE AGAROSE COM RESULTADO DE PCR FEITO A PARTIR DO DNA GENÔMICO.....	48
FIGURA 8 - EXEMPLO DE OTIMIZAÇÃO DE PCR DO GENE A08.....	49
FIGURA 9 – RESULTADO DE ELETROFORESE DE PCR DE COLÔNIA.....	50
FIGURA 10 – RESULTADO DA MINIPREP (A) E DA PCR DE MINIPREP (B) PARA OS GENES QUE TIVERAM RESULTADO NEGATIVO NA PCR DE COLÔNIA.....	51
FIGURA 11 – GEL DE AGAROSE RESULTANTE DE <i>TOOTHPICK</i>	52
FIGURA 12 – GEL RESULTANTE DE PURIFICAÇÃO DE PLASMÍDEOS.....	53
FIGURA 13 – GEL DE AGAROSE RESULTANTE DE PCR DE MINIPREP.....	53
FIGURA 14 - GEL RESULTANTE DA ELETROFORESE SDS-PAGE DO TESTE DE EXPRESSÃO.....	57
FIGURA 15 – <i>WESTERN-BLOT</i> COM ANTI-HISTIDINA DO TESTE DE EXPRESSÃO.....	57
FIGURA 16 – EXPRESSÕES EM LARGA ESCALA.....	58
FIGURA 17 – SDS-PAGE DA PROTEÍNA A11 PURIFICADA.....	59
FIGURA 18 – RESULTADO DO <i>WESTERN-BLOT</i> DO EXTRATO DE PROTEÍNAS CONTRA OS SOROS DOS CAMUNDONGOS.....	60
FIGURA 19 – RESULTADO DAS IMUNOFLUORESCÊNCIAS.....	60
FIGURA 20 - EXPRESSÃO DA PROTEÍNA A11 EM DIFERENTES AMOSTRAS DA METACICLOGÊNESE.....	61
FIGURA 21 – RESULTADO DE <i>WESTERN-BLOT</i> UTILIZANDO O SORO COM ANTICORPOS PURIFICADOS.....	62
FIGURA 22 – RESULTADO DO <i>WESTERN-BLOT</i> UTILIZANDO O SORO COM ANTICORPOS.....	62
FIGURA 23 – RESULTADO DO <i>WESTERN-BLOT</i> E DETECÇÃO DA PROTEÍNA UTILIZANDO O SORO PURIFICADO.....	63
FIGURA 24 – RESULTADO DO <i>WESTERN-BLOT</i> COMPETITIVO.....	64
FIGURA 25 - EXPRESSÃO DA PROTEÍNA A11 EM DIFERENTES AMOSTRAS DA METACICLOGÊNESE.....	65
FIGURA 26 – RESULTADO DE MICROARRANJO QUE MOSTRA A EXPRESSÃO, EM NÍVEL DE mRNA, DURANTE DIFERENTES MOMENTOS DA METACICLOGÊNESE.....	65
FIGURA 27 – EXPRESSÃO EM LARGA ESCALA DA PROTEÍNA B01.....	66
FIGURA 28 - <i>WESTERN-BLOT</i> DA PROTEÍNA B01 COM ANTI-HISTIDINA.....	67
FIGURA 29 – RESULTADO DE SDS-PAGE COM A SOLUÇÃO DA PROTEÍNA B01 PURIFICADA.....	67
FIGURA 30 – SDS-PAGE DA PROTEÍNA E03 PURIFICADA.....	68
FIGURA 31 – <i>WESTERN-BLOT</i> DO EXTRATO DE PROTEÍNAS CONTRA O SORO DOS CAMUNDONGOS.....	69

FIGURA 32 – RESULTADO DO <i>WESTERN-BLOT</i> COMPETITIVO E DETECÇÃO DA PROTEÍNA UTILIZANDO O SORO PURIFICADO	69
FIGURA 33 – EXPRESSÃO DA PROTEÍNA E03 EM DIFERENTES AMOSTRAS DA METACICLOGÊNESE	71
FIGURA 34 – RESULTADO DE MICROARRANJO QUE MOSTRA A EXPRESSÃO, EM NÍVEL DE mRNA, DURANTE DIFERENTES MOMENTOS DA METACICLOGÊNESE	71
FIGURA 35 – RESULTADO DAS IMUNOFLUORESCÊNCIAS.....	72
FIGURA 36 – RESULTADO DE IMUNOLOCALIZAÇÃO POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	73
FIGURA 37 – RESULTADO DO <i>TOOTHPICK</i> APRESENTADO EM GEL DE AGAROSE.....	74
FIGURA 38 – RESULTADO DA MINI-PREPARAÇÃO E PCR DE PLASMÍDEOS APRESENTADO EM GEL DE AGAROSE	74

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – GENES CODIFICADORES DE PROTEÍNAS HIPOTÉTICAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS, SELECIONADOS PARA ESTE TRABALHO	49
TABELA 2 – GENES CLONADOS NO VETOR DE EXPRESSÃO E O RESPECTIVO TAMANHO DA PROTEÍNA CODIFICADA (EM kDa).	55

LISTA DE ABREVIATURAS

BCIP	– 5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolyphosphate p-Toluidine Salt
BLAST	– <i>Basic Local Alignment Search Tool</i> (Ferramenta para Pesquisa Básica de Alinhamento Local)
BSA	– Bovine Serum Albumine (Albumina Bovina Sérica)
DAPI	– 4'6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride
DEAE	– Dietilaminoetil
DNA	– Ácido Desoxirribonucléico
DO	– Densidade ótica
<i>E. coli</i>	– <i>Escherichia coli</i>
EDTA	– Ácido etileno-diamino-tetracético
GFP	– <i>Green Fluorescent Protein</i> (Proteína Fluorescente Verde)
IPTG	– Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
kDa	– Quilo Dalton
LB	– Luria-Bertani
mRNA	– RNA mensageiro
NBT	– Nitro-Blue Tetrazolium Chloride
ORF	– <i>Open Reading Frame</i> (Quadro Aberto de Leitura)
pb	– Pares de bases de nucleotídeos
PBS	– Tampão fosfato salina
PCR	– Reação em Cadeia da Polimerase
RNA	– Ácido Ribonucléico
SDS	– Dodecil Sulfato de Sódio
<i>T. cruzi</i>	– <i>Trypanosoma cruzi</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 DOENÇA DE CHAGAS	13
1.2 TRANSMISSÃO E CICLO DE VIDA DO <i>Trypanosoma cruzi</i>	14
1.3 EXPRESSÃO GÊNICA EM <i>Trypanosoma cruzi</i>	16
1.4 JUSTIFICATIVA.....	17
2 OBJETIVOS.....	18
2.1 OBJETIVO GERAL.....	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
3.1 PROCEDÊNCIA DE REAGENTES E MATERIAIS.....	19
3.2 MEIOS DE CULTURA, SOLUÇÕES E TAMPÕES.....	21
3.3 SOFTWARES UTILIZADOS.....	23
3.4 OBTENÇÃO DE DNA DE <i>T. cruzi</i>	23
3.5 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) PARA AMPLIFICAÇÃO DOS GENES SELECIONADOS.....	24
3.6 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE.....	26
3.7 CLONAGEM DO PRODUTO DA PCR EM VETOR PENTR™/D-TOPO®.....	26
3.8 TRANSFORMAÇÃO DAS CÉLULAS CÁLCIO-COMPETENTES COM O VETOR	28
3.9 SELEÇÃO DE COLÔNIAS POSITIVAS POR PCR DE COLÔNIA OU POR TOOTH PICK.....	29
3.9.1 Seleção de colônias positivas por PCR de colônia	29
3.9.2 Seleção de colônias positivas por <i>toothpick</i>	30
3.10 EXTRAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL (MINIPREP)	30
3.10.1 PCR de plasmídeo	31
3.11 RECOMBINAÇÃO NO VETOR DE EXPRESSÃO PDEST™17	31
3.12 SEQUENCIAMENTO DAS EXTREMIDADES DOS INSERTOS	33
3.13 CULTIVO DO <i>T. cruzi</i> E OBTENÇÃO DAS DIFERENTES FORMAS DO CICLO DE VIDA PARA OBTENÇÃO DE EXTRATO PROTÉICO DO <i>T. cruzi</i>	33
3.14 EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....	34
3.14.1 Teste de expressão das proteínas recombinantes.....	35
3.14.2 Preparação de extrato de proteínas da bactéria <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS	36
3.14.3 Produção em larga escala das proteínas recombinantes.....	36
3.15 ELETROFORESE DE PROTEÍNA EM GEL DE POLIACRILAMIDA DESNATURANTE (SDS-PAGE).....	38
3.16 WESTERN-BLOT	39
3.17 PURIFICAÇÃO ATRAVÉS DE GEL PREPARATIVO	40
3.17.1 Quantificação da proteína purificada.....	40
3.18 INOCULAÇÕES EM CAMUNDONGOS	41
3.18.1 Avaliação dos anticorpos presentes no soro pré-imune.....	41
3.18.2 Inoculações das proteínas purificadas em camundongos.....	42
3.18.3 Verificação da produção de anticorpos contra a proteína recombinante.....	42

3.20 TRANSFEÇÃO EM <i>T. cruzi</i> COM O GENE INSERIDO NO VETOR pTcPR-GFPN	46
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.2 SEQÜENCIAMENTO.....	55
4.3 EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....	56
4.3.1 Proteínas A02 (29,3 kDa), A04 (30,7 kDa), B02 (19,6 kDa) e E05 (83,9 kDa).....	58
4.3.2 Proteína A11 (29,6 kDa).....	59
4.3.3 Proteína B01 (27,9 kDa).....	66
4.3.4 Proteína E03 (41,9 kDa).....	68
5 CONCLUSÕES.....	75
REFERÊNCIAS.....	77
ANEXO	81

1 INTRODUÇÃO

O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário flagelado unicelular pertencente à família Tripanosomatidae, ordem Kinetoplastida. Este organismo infecta algumas espécies de mamíferos, entre eles, o homem. À enfermidade humana decorrente denominamos doença de Chagas. De acordo com a Organização Mundial da Saúde, 16 a 18 milhões de pessoas estão infectadas com *T. cruzi* em 18 países (México na América do Norte e todos os países da América Central e América do Sul). Cento e vinte milhões de pessoas estão expostas ao risco de infecção. Há 21.000 mortes anualmente em decorrência da doença e 2 a 3 milhões de pessoas possuem complicações crônicas. Estima-se que no Brasil haja 5 milhões de pessoas infectadas (<http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/>).

O material genético do *T. cruzi* está localizado em duas estruturas: núcleo e mitocôndria. Em 2005 foi publicado o primeiro esboço referente à montagem do genoma de *T. cruzi*. A cepa utilizada para o seqüenciamento foi a CL Brener, por ser uma das mais bem caracterizadas experimentalmente. A estimativa do tamanho do genoma haplóide desta cepa é de aproximadamente 55 Mpb. Foram identificados 23.216 elementos codificadores de proteínas dos quais 11.398 possuem função conhecida confirmada experimentalmente ou por homologia e 11.818 genes foram anotados como codificadores de proteínas hipotéticas (EL-SAYED *et al.*, 2005a). Genes codificadores de proteínas hipotéticas são regiões codificadoras preditas que representam um Quadro Aberto de Leitura (ORF), mas cujas proteínas ainda não foram caracterizadas. São ditos genes codificadores de proteínas hipotéticas conservadas caso haja uma ORF com similaridade em outro organismo (geralmente *Trypanosoma brucei* e/ou *Leishmania major*). Dos genes codificadores de proteínas hipotéticas de *T. cruzi*, 85% dos genes codificam proteínas hipotéticas conservadas. (EL-SAYED *et al.*, 2005a).

Este trabalho baseou-se em metodologias de larga escala (também conhecido por *high-throughput*, em inglês). Nesta abordagem, iniciou-se o estudo dos 57 genes selecionados visando a caracterização mais aprofundada de um subconjunto deles.

Para o estudo destas proteínas, os genes foram amplificados para obtenção da ORF completa e inseridos em vetores da plataforma Gateway® (Invitrogen), que permitem a manutenção e replicação destes genes, além da possibilidade de recombinação para diversos tipos de vetores. Depois de inseridos em um vetor de expressão, os genes foram expressos em sistemas heterólogos, e as proteínas foram inoculadas em camundongos para produção de anticorpos específicos, que foram utilizados em imunoenaios para verificação da expressão da proteína nas diferentes fases do ciclo de vida e para verificação da localização celular. Dos cinquenta e sete genes iniciais, vinte e sete genes apresentaram produto adequado de PCR e, destes, vinte foram inseridos no vetor de expressão. Estas etapas foram realizadas por uma equipe do Instituto de Biologia Molecular do Paraná, durante o primeiro semestre de 2007. O trabalho de caracterização, propriamente dito, continuou no final de 2007 e durante 2008, com a expressão das proteínas em sistemas heterólogos para inoculações em camundongos, que produziram anticorpos específicos contra a proteína recombinante, utilizados em ensaios que serão descritos no presente trabalho.

1.1 DOENÇA DE CHAGAS

Em 1909, Carlos Chagas descreve uma nova enfermidade, reportando não apenas seus elementos clínicos, anatomopatológicos e epidemiológicos, como, também, seu agente etiológico – um protozoário flagelado (originalmente, *Schizotrypanum cruzi*; hoje, *Trypanosoma cruzi*) –, algumas espécies vetoras transmissoras do parasita – insetos da Ordem Hemiptera – e alguns reservatórios silvestres (CHAGAS, 1909).

Após a infecção, há um período de incubação que depende da forma de transmissão do *T. cruzi* – aproximadamente uma semana quando a transmissão é vetorial e de 20 dias a 3 meses quando a transmissão é transfusional. A doença de Chagas compreende, basicamente, duas fases: a fase aguda e a fase crônica. As características de cada fase, assim como a evolução para a cura ou óbito, dependem de diversos fatores ligados ao *T. cruzi* – como cepa, virulência e tamanho

do inóculo –, ao homem – idade, sexo e provavelmente raça – e ao ambiente (revisto por CANÇADO, 2000).

A fase aguda da doença é usualmente silenciosa. Quando aparente – principalmente em crianças de baixa idade – os sintomas podem ser febre, dor de cabeça, edema, linfadenopatia, hepatoesplenomegalia, miocardite, meningoencefalite e cardiopatia aguda. O conjunto e a intensidade dos sintomas é bastante variável de caso a caso. Esta fase dura aproximadamente de 4 a 12 semanas e é caracterizada por elevada parasitemia (revisto por DIAS, 2000).

A fase crônica se inicia com a diminuição da parasitemia e dos níveis de imunoglobulinas do tipo IgM e aumento das do tipo IgG. A evolução desta fase é lenta e pode durar toda a vida do paciente. Esta fase crônica pode ser representada por diversas formas clínicas: a indeterminada, a cardíaca ou a digestiva. A forma indeterminada se caracteriza por ausência de sintomatologia. A morbimortalidade da doença de Chagas está associada às formas cardíaca e digestiva, que constituem evoluções da forma indeterminada em 2 a 5% dos casos. A primeira se caracteriza por uma cardiopatia crônica, cujo aspecto mais importante é a fibrose (ANDRADE *et al.*, 1978). A forma digestiva caracteriza-se por esofagopatia e colopatia (revisto por DIAS, 2000).

1.2 TRANSMISSÃO E CICLO DE VIDA DO *Trypanosoma cruzi*

Há três maneiras principais de transmissão da doença de Chagas: a vetorial, a transfusional e a congênita. Entretanto, a transmissão por via oral é responsável por um número significativo dos casos agudos da doença na Amazônia Brasileira (COURA *et al.*, 2002). Alimentos contendo ou o inseto-vetor ou suas fezes seriam a fonte de infecção. De menor impacto, há a contaminação através de transplantes de órgão e acidentes de laboratório (revisto por SCHMUÑIS, 2000).

A via vetorial de transmissão da doença é a responsável pela grande maioria dos casos registrados. Ela consiste na transmissão do *T. cruzi* através do inseto-vetor hematófago. Há várias espécies que naturalmente albergam o parasita, todas da ordem Hemiptera, família Reduviidae, subfamília Triatominae. Os triatomíneos

são conhecidos como “barbeiros”, entre outros nomes vulgares. Os gêneros de maior importância epidemiológica são *Triatoma*, *Panstrongylus* e *Rhodnius*. Acredita-se que os vetores, predominantemente silváticos, passaram a ter uma distribuição que se sobrepõe com a da espécie humana em decorrência de modificações realizadas pelo próprio homem no meio ambiente (SHERLOCK, 2000; GARCIA e AZAMBUJA, 2000).

O ciclo silvestre caracteriza-se pela circulação do parasita entre os hospedeiros vertebrados e invertebrados em um ambiente silvático. Neste ciclo encontram-se mamíferos de pequeno porte, como marsupiais, desdentados, roedores, quirópteros, carnívoros e lagomorfos. Esta relação, estabelecida há milhares de anos no Continente Americano, atingiu um equilíbrio tal de forma que não se observa dano nem para o parasita e nem para nenhum dos hospedeiros que o albergam. O segundo ciclo – o doméstico – caracteriza-se pela introdução do *T. cruzi* em ambientes em urbanização, mas aos quais os vetores ainda têm importante acesso. Profundas alterações do meio ambiente, realizadas pelo homem, modificaram a distribuição de vetores e reservatórios silvestres, inserindo as populações humanas no ciclo de *T. cruzi*. Sendo assim, o homem passa a ser o mais recente reservatório mamífero e, como consequência desta nova relação, tanto o parasita quanto o homem travam uma batalha para a sobrevivência, que macroscopicamente e antropocentricamente, revela-se como a doença de Chagas (revisto por DIAS, 2000).

O ciclo de vida do *T. cruzi* compreende dois tipos de hospedeiros: um vertebrado (mamífero) e um invertebrado (inseto). O ciclo de vida do *T. cruzi* no hospedeiro vertebrado se inicia quando tripomastigotas metacíclicos – presentes nas excretas do vetor – infectam células da pele ou mucosas do mamífero. A partir do local de infecção inicial, os parasitas podem atingir a corrente sangüínea e infectar outros tipos celulares. Após algumas horas no interior do vacúolo parasitóforo, os tripomastigotas metacíclicos escapam para o citoplasma onde se diferenciam em amastigotas, formas que se replicam no interior da célula. Após intensa divisão binária, os amastigotas diferenciam-se em tripomastigotas sangüíneos que rompem as células hospedeiras com o movimento intenso dos flagelos. Uma vez na corrente sangüínea os tripomastigotas podem infectar outras células ou serem ingeridos pelo inseto. No tubo digestivo do inseto, os tripomastigotas se instalam e evoluem para a forma replicativa epimastigota que, após repetidas divisões por fissão binária,

migram para a porção posterior do intestino e transformam-se em tripomastigotas metacíclicos, finalizando o ciclo (revisto por BRENER, 1973 e TYLER e ENGMAN, 2001). O ciclo de vida do *T. cruzi* está representado na figura 1.

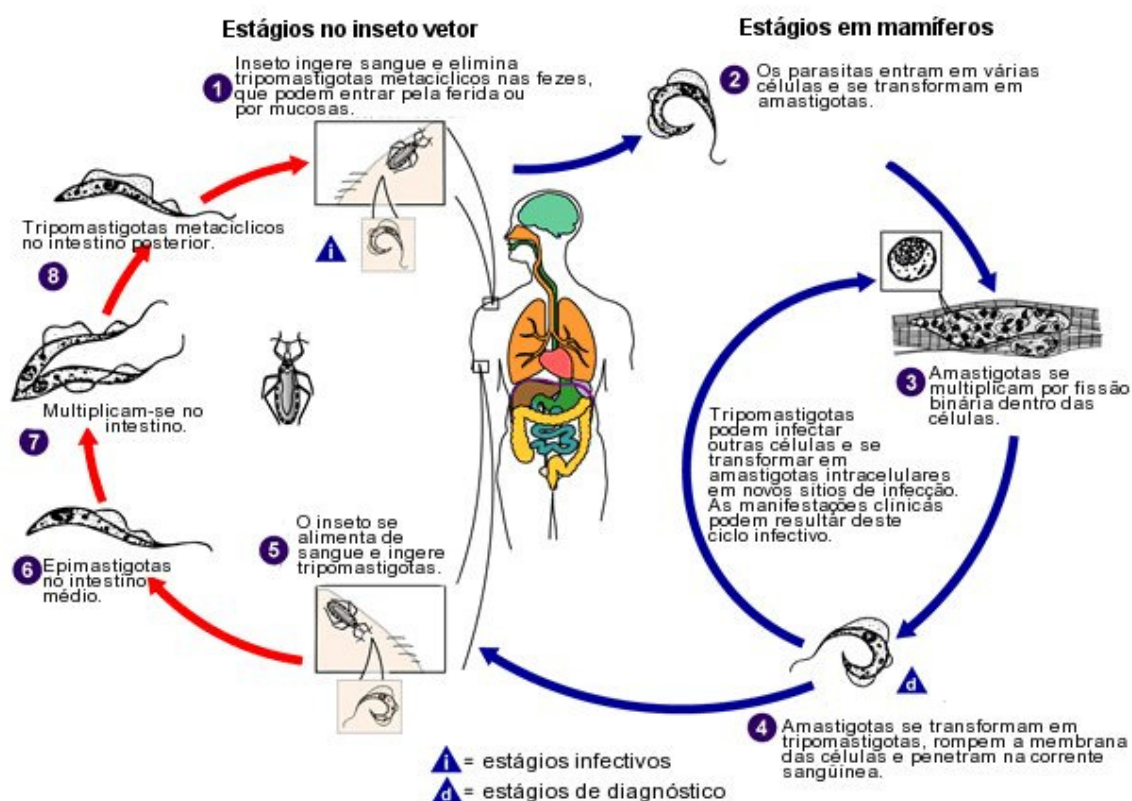


FIGURA 1 - CICLO DE VIDA DO *T. cruzi*. AQUI, O HOSPEDEIRO VERTEBRADO ESTÁ REPRESENTADO POR UM HUMANO, MAS O CICLO DO *T. cruzi* PODE OCORRER EM DIFERENTES MAMÍFEROS
MODIFICADO DE: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/>

1.3 EXPRESSÃO GÊNICA EM *Trypanosoma cruzi*

Sabe-se que há uma reprogramação da expressão gênica no *T. cruzi* à medida que ele vai passando pelos diferentes estágios do ciclo de vida, refletido nas diferenças morfológicas, ultra-estruturais, funcionais e bioquímicas conforme ele vai diferenciando. O proteoma celular é particular de cada estágio, dando ao parasita as características morfológicas e funcionais compatíveis com sua sobrevivência nos diferentes ambientes. Experimentalmente, estas diferenças podem ser observadas analisando-se os produtos da tradução *in vitro* de RNA em gel do tipo bi-dimensional

(GOLDENBERG *et al.*, 1985), utilizando-se anticorpos específicos para determinadas proteínas e analisando-se o RNA em *northern blot* (ÁVILA *et al.*, 2003).

A análise da expressão gênica no nível do transcriptoma pode ser realizada de uma forma ampla utilizando-se os microarranjos de DNA. Na literatura, existem diversos trabalhos utilizando microarranjos para avaliar a expressão diferencial de tripanossomatídeos (DIEHL *et al.*, 2002; GUIMOND *et al.*, 2003; MINNING *et al.*, 2003; SAXENA *et al.*, 2003; AKOPYANTS *et al.*, 2004; ALMEIDA *et al.*, 2004; BAPTISTA *et al.*, 2004; BREMS *et al.*, 2005; BAPTISTA *et al.*, 2006; HOLZER *et al.*, 2006; McNICOLL *et al.*, 2006; LEIFSO *et al.*, 2007; SAXENA *et al.*, 2007; SRIVIDYA *et al.*, 2007; KOUMANDOU *et al.* 2008). Esses trabalhos avaliam uma ampla gama de condições biológicas de diversos organismos, incluindo o transcriptoma de *T. cruzi* (MINNING *et al.*, 2003; BAPTISTA *et al.*, 2004; BAPTISTA *et al.*, 2006).

Em nosso laboratório, experimentos de microarranjo de DNA para analisar a expressão gênica diferencial detectaram aproximadamente 25% dos genes de *T. cruzi* como tendo sua expressão diferencial em pelo menos uma das formas principais do ciclo de vida: epimastigotas, amastigotas, tripomastigotas metacíclicos e tripomastigotas de cultura celular (PAVONI *et al.*, em preparação).

Uma porcentagem grande destes genes diferencialmente expressos (aproximadamente 55%) são codificadores de proteínas hipotéticas, ou seja, são genes cujo produto ainda não foi estudado. Este número é um reflexo da porcentagem de genes codificadores de proteínas hipotéticas identificados no genoma de *T. cruzi*, que é de aproximadamente 50% (El SAYED *et al.*, 2005b).

1.4 JUSTIFICATIVA

É urgente a necessidade da identificação de proteínas do *T. cruzi* que possam servir como alvos para novas drogas. Proteínas cuja expressão é regulada durante o ciclo de vida e que podem ser evolutivamente bastante distantes das de mamíferos, uma vez que ainda não foram estudadas, são candidatas ideais para serem alvos de quimioterápicos, já que orientariam ao desenvolvimento de uma

quimioterapia extremamente direcionada. Este projeto tem como objetivo aprofundar os estudos sobre estas proteínas, o que vai aumentar o leque de possibilidades de ação contra um patógeno causador de uma doença debilitante e com profundas implicações sociais no Brasil e na América Latina. Além disto, o entendimento do controle da diferenciação celular em *T. cruzi*, processo no qual uma porcentagem grande de proteínas hipotéticas parecem estar envolvidas, poderia contribuir grandemente para o controle da doença de Chagas e de sua transmissão.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O projeto tem como objetivo buscar a caracterização de proteínas hipotéticas codificadas por genes diferencialmente expressos durante o ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*, selecionados a partir de dados obtidos através da metodologia de microarranjo de DNA.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Clonar os genes no vetor de expressão da plataforma Gateway®;
- Expressar as proteínas recombinantes;
- Inocular as proteínas em camundongos para obtenção de anticorpos;
- Realizar imunoenaios para verificação da expressão protéica nas diferentes fases do ciclo de vida e para verificação da localização celular.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 PROCEDÊNCIA DE REAGENTES E MATERIAIS

- **AMERSHAM-PHARMACIA BIOTECH:**
 - Anticorpo monoclonal anti-histidina 1,4 – 2,8 mg/ml
 - dNTPs
 - *Hybond* membrana de nitrocelulose
 - *Hyperfilm* MP
- **APPLIED BIOSYSTEMS:**
 - *BigDye® Terminator* v3.1 *kit*
- **BECTON DICKINSON:**
 - Extrato de levedura
- **BioRad:**
 - Azul de bromofenol
- **Cult-Lab:**
 - Soro fetal bovino
- **DIFCO:**
 - Triptose
- **FERMENTAS:**
 - *PageRuler™ Unstained Protein Ladder*
- **FISHER SCIENTIFIC:**
 - Meio de cultura *Luria Bertani*
- **GenScript:**
 - oligonucleotídeos
- **GIBCO:**
 - EDTA
 - Gentamicina
 - RPMI
- **QIAGEN:**
 - *QIAprep Spin Miniprep kit*

- **INVITROGEN:**

- 1 Kb Plus DNA *Ladder*
- BenchMark™ Protein Ladder
- Fenol
- *kit* de clonagem pENTR™ Directional TOPO®
- *kit* Gateway® LR Clonase™ II enzyme mix
- LR Clonase II *enzyme* mix
- Proteinase K
- Sacarose
- *Taq* DNA Polimerase
- Vetor pDEST™17
- Vetor pENTR™/D-TOPO®

- **MERCK:**

- Ácido acético
- Ácido bórico
- Fosfato dibásico de sódio
- Glicose
- SDS
- Sulfato de amônio

- **PROMEGA:**

- BCIP
- Fosfatase Alcalina
- NBT

- **QIAGEN:**

- *QIAprep Spin Miniprep Kit*

- **SIGMA-ALDRICH:**

- β-mercaptoetanol
- Adjuvante
- Agarose
- Ampicilina
- Anti-mouse AP
- Anti-mouse Alexa
- Brometo de etídeo

- BSA
- Canamicina
- Cicloheximidina
- Cloranfenicol
- Cloreto de amônio
- DEAE-celulose
- Ficol
- Heparina
- Paraformaldeído
- Poli-L-lisina
- Ponceau S
- Triton
- **STRATAGENE:**
 - *Pfu* Ultra DNA Polimerase
- **USB:**
 - IPTG
 - L-glutamina
- **VETEC:**
 - Glicina

3.2 MEIOS DE CULTURA, SOLUÇÕES E TAMPÕES

- Brometo de etídio: solução 0,5 µg/mL
- Gel de corrida de poliacrilamida para eletroforese de proteínas: acrilamida:bisacrilamida 33%:0,9% na concentração desejada, Tris-HCl 400 mM pH 8,8, SDS 0,1%, persulfato de amônio 0,075% e TEMED 0,07%
- Gel de empilhamento de poliacrilamida para eletroforese de proteínas: 4,75% de acrilamida 33/0,9%, Tris-HCl 120 mM pH 6,8, SDS 0,1%, persulfato de amônio 0,075%, TEMED 0,07%
- H₂O ultra-pura: sistema de purificação de água da Elga
- Meio LB (*Luria Bertani*): triptona 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L, NaCl 5 g/L

- Meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*): extrato de levedura 15 g/l; fosfato dibásico de sódio 11,56 g/l; glicose 2,2 g/l; hemina 0,02 g/l; infuso de fígado 5 g/l; KCl 0,4 g/l; NaCl 4,4 g/l; soro fetal bovino 10% (v/v) e triptose 5 g/l. pH 7,2 ajustado com HCl
- Meio LIT B + penicilina: extrato de levedura 15 g/L, fosfato dibásico de sódio 11,56 g/L, glicose 2,2 g/L, hemina 0,02 g/L, infuso de fígado 5 g/L, KCl 0,4 g/L, NaCl 4,4 g/L, soro fetal bovino 10 % (v/v), triptose 5 g/L, penicilina 63 mg/L, pH ajustado para 7,2 com HCl
- Meio TAU (*Triatomine Artificial Urine*): CaCl_2 2 mM; KCl 17 mM; MgCl_2 2 mM; NaCl 190 mM; tampão fosfato pH 6,0 8 mM
- PBS 10X: KCl 2,7 mM, KH_2PO_4 1,5 mM, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4,3 mM, NaCl 137 mM
- *Ponceau S*: Ponceaus S Sigma P-3504 0,5%, ácido acético 1%
- Solução de azul de coomassie: azul de coomassie R-250 0,1%, metanol 45%, ácido acético 10%
- Solução de bloqueio 5%: 5% leite em pó desnatado em TBS-Tween 0,1%
- Solução de descoloração para SDS-*page*: metanol 4%, ácido acético 7,5%
- Solução de eletroporação: NaCl 140 mM, HEPES ácido 25 mM, Na_2HPO_4 0,74 mM
- Tampão de revelação para fosfatase alcalina (*AP-buffer*): Tris-HCl 100 mM pH 9,5, NaCl 100 mM, MgCl_2 5 mM
- Tampão com uréia 2 M: NaH_2PO_4 100 mM, Tris 10 mM, uréia 2 M, NaCl 0,5 M, Triton 2%, pH 8,0
- Tampão com uréia 8 M: NaH_2PO_4 100 mM, Tris 10 mM, uréia 8 M, pH 8,0
- Tampão de amostra para SDS-*page* 4X (referido no texto como tampão de amostra 4X): Tris-HCl 160 mM pH 6,8, SDS 4%, β -mercaptoetanol 1,47 M, glicerol 24 %, azul de bromofenol ~0,02 %
- Tampão de aplicação de eletroforese em gel de agarose (referido no texto como tampão de aplicação): Ficol 10X: 0,21% azul de bromofenol; 0,21% xileno cianol FF; 0,2 M EDTA pH 8,0; 50% glicerina
- Tampão de lise celular hipotônico: β -mercaptoetanol 5 mM; cicloheximida 10 $\mu\text{g/ml}$; heparina 20 U/ml; MgCl_2 5 mM; NaCl 10 mM e tris-HCl pH 7,6 10 mM
- Tampão de corrida SDS-*page*: Tris 255 mM, Glicina 192 mM, SDS 1%

- Tampão de lise para *toothpick*: NaOH 50 mM, Glicerol 5%, SDS 0,5%, EDTA 5mM, água ultra-pura para completar 1 ml e 1,5 mg azul de bromofenol
- Tampão de sonicação: Tris-HCl pH 8,0 20 mM, NaCl 0,5 M, Triton x-100 2%
- Tampão de transferência: Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%
- Tampão NKM: cicloheximida 10 µg/ml; heparina 20 U/ml; hepes pH 7,4 10 mM; KCl 5 mM; MgCl₂ 1,5 mM e NaCl 140 mM
- Tampão TBE 10X: 0,89 M Tris base; 0,89 M Ácido bórico; 0,02 M EDTA; pH 8,3
- Tampão TBS 10X: Tris-HCl 20 mM pH 8,0; NaCl 150 mM
- Tampão TBS/Tween 0,1%: Tampão TBS 1X + Tween 20 0,1%
- Tampão TE: Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM pH 8,0

3.3 SOFTWARES UTILIZADOS

- **DNASTAR:** EditSeq, MegAlign e PrimerSelect, do *Software* Lasergene
- **MEDIA CYBERNETICS:** Image Pro-Plus v. 4.5.1.22
- **UVP:** LabWorks Analysis Software

3.4 OBTENÇÃO DE DNA DE *T. cruzi*

A extração e purificação das moléculas de DNA foram realizadas segundo Fragoso e Goldenberg (1992). Assim, 1×10^{10} células de protozoários na forma epimastigotas foram obtidas por centrifugação – 8.000 g por 10 minutos a 10°C –, lavadas em tampão NKM e recuperadas nas mesmas condições de centrifugação. A lise dos parasitas foi realizada com aproximadamente 5×10^9 células em 13 ml de tampão de lise celular hipotônico, acrescido de cicloheximida 10 µg/ml, heparina 20 U/ml, β-mercaptoetanol 5mM e 1 % (v/v) de Nonidet P-40. As células foram lisadas dentro de um homogeneizador de células tipo Dounce, por aproximadamente 3

minutos, a 4°C, e observadas periodicamente ao microscópio. Quando as células, conservando ainda sua morfologia, tornaram-se translúcidas, a lise celular foi interrompida pela adição de sacarose 0,25 M, acrescida de cicloheximida 10 µg/ml, heparina 20 U/ml e β-mercaptoetanol 5 mM. A seguir, foram sedimentados os núcleos – 9.000 g por 10 minutos que foram parcialmente purificados em três ciclos de centrifugação a 800 g, por 10 minutos, a 4°C. Esta fração foi incubada em EDTA 5 mM, NaCl 10 mM, proteinase K 100 µg/ml, SDS 0,5 % e Tris-HCl pH 7,6 10 mM, por 12 horas, a 37°C. O DNA foi extraído com fenol saturado e purificado em várias diálises em EDTA 1 mM, NaCl 100 mM e tris-HCl pH 7,6 10 mM.

3.5 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) PARA AMPLIFICAÇÃO DOS GENES SELECIONADOS

Para clonagem dos genes em questão, precisava-se isolá-los do genoma do *T. cruzi*, a partir de uma PCR em que a seqüência de DNA específica era amplificada em múltiplas cópias (figura 2). Para essa reação, foram desenhados um par de oligonucleotídeos iniciadores (“*Forward*” e “*Reverse*”) visando a amplificação de toda a região codificadora para cada gene. Os oligonucleotídeos foram desenhados no programa PrimerSelect do Software Lasergene (DNASTAR, Inc.) baseadas nas seqüências depositadas no banco de dados disponível no site <http://www.genedb.org> (a seqüência dos iniciadores, assim como o tamanho da seqüência entre eles – o amplicon – está exibida em anexo). Para a inserção dos genes no vetor pENTR™/D-TOPO® (Invitrogen), o oligonucleotídeo “*Forward*” precisou ser desenhado contendo os nucleotídeos 5'-CACC-3' na extremidade 5' para orientar a posição de ligação do inserto com o vetor.

As PCRs eram feitas utilizando Pfu DNA polimerase em tampão Pfu 1X, 0,2 µM de cada iniciador, 0,25 mM de desoxirribonucleotídeos e 20 ng do DNA genômico extraído de *T. cruzi*. As amostras eram colocadas no termociclador *Mastercycler* (Eppendorf) com o programa inicial da PCR de: 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de 94°C por 45 segundos (desnaturação), 55°C por 45 segundos (anelamento) e 72° C por um tempo que variava de acordo com o tamanho da

seqüência a ser amplificada, seguindo o princípio de 1 minuto para cada mil pares de bases (extensão). Após o ciclo de repetição, as reações eram mantidas por 10 minutos a 72°C.

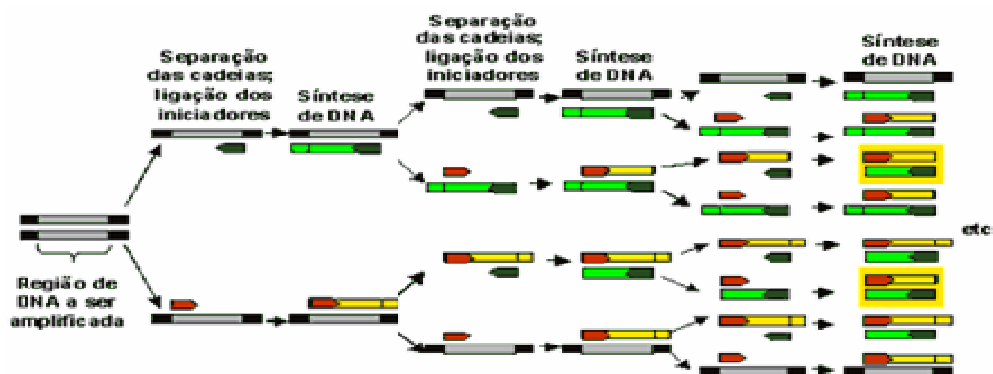




FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PROCESSO DE PCR. A FIGURA MOSTRA TRÊS CICLOS DE REPETIÇÃO. PRIMEIRAMENTE HÁ SEPARAÇÃO DAS FITAS DE DNA, PROVOCADA PELA TEMPERATURA DE 94°C (DESNATURAÇÃO); A TEMPERATURA ABAIXA PARA 55°C QUANDO OCORRE A LIGAÇÃO DOS INICIADORES (REPRESENTADOS, NA FIGURA, PELOS SÍMBOLOS  E ) COM SUA SEQÜÊNCIA COMPLEMENTAR, NA FITA DE DNA (ANELAMENTO); FINALMENTE, PARA A SÍNTESE DE DNA, A TEMPERATURA AUMENTA PARA 72°C, QUE É A TEMPERATURA ÓTIMA PARA A ENZIMA PFU DNA POLIMERASE (EXTENSÃO). A TEMPERATURA AUMENTA NOVAMENTE PARA 94°C, INICIANDO O SEGUNDO CICLO, E ASSIM SUCESSIVAMENTE

FONTE: <http://www.e-escola.pt/site/topico.asp?topico=339>

As amostras que apresentavam única banda com o tamanho esperado (resultado visualizado através de eletroforese, tópico seguinte) estavam prontas para serem clonadas no vetor pENTR™/D-TOPO®. As PCRs de amostras que não tiveram seqüências amplificadas ou que tiveram mais do que uma seqüência amplificada, pela observação de diferentes bandas, precisaram ser refeitas com outras condições de temperatura de anelamento e/ou de extensão. Como maior temperatura de anelamento significa maior especificidade pelos oligonucleotídeos iniciadores, nos casos em que houve mais do que uma seqüência amplificada, a temperatura de anelamento foi aumentada visando à amplificação de uma única seqüência. Nos casos em que não houve amplificação, a temperatura de anelamento foi diminuída visando à amplificação da seqüência desejada.

3.6 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Para observação da amplificação dos produtos de PCR, 5 µl das amostras misturadas com tampão de aplicação eram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% colocado em uma cuba de eletroforese submerso em tampão TBE 1X. Para comparação do tamanho das seqüências amplificadas, eram utilizados 3 µl do marcador 1 Kb plus DNA *Ladder* (1 Kb plus). O sistema era submetido a uma voltagem de 100 V por cerca de 50 minutos. O gel era colocado por 30 minutos em uma solução de brometo de etídio e submetido à luz com comprimento de onda de 260 nm (faixa de ultravioleta), no sistema de captação de imagem UV White Darkroom da UVP Bioimaging Systems, sendo as imagens analisadas com o programa Labworks.

3.7 CLONAGEM DO PRODUTO DA PCR EM VETOR PENTR™/D-TOPO®

O *kit* de clonagem pENTR™ Directional TOPO® utiliza uma estratégia de clonagem altamente eficiente ("TOPO® Cloning") para clonar direcionalmente o produto final de uma reação de PCR em um vetor de entrada do sistema Gateway® (Invitrogen). A figura 3 representa como ocorre a clonagem.

O vetor utilizado, pENTR™/D-TOPO® (figura 4), é constituído por:

- a) seqüências T1 e T2 para término de transcrição, que reduz o potencial de toxicidade em *Escherichia coli* pela prevenção da expressão basal do produto de PCR
- b) sítios *attL1* e *attL2* para recombinação específica do clone de entrada com um vetor de destinação Gateway®. Os sítios *attL1* e *attL2* são seqüências de recombinação derivadas do bacteriófago λ que permitem clonagem por recombinação de um gene de interesse na construção de entrada com um vetor de destinação Gateway® (Landy, 1989. In: <http://www.invitrogen.com>);
- c) sítio para clonagem direcional, utilizando a enzima Topoisomerase I;

- d) gene de resistência para canamicina permitindo a seleção do plasmídeo em *E. coli*;
- e) origem pUC propiciando alta taxa de replicação e manutenção do plasmídeo em *E. coli*.

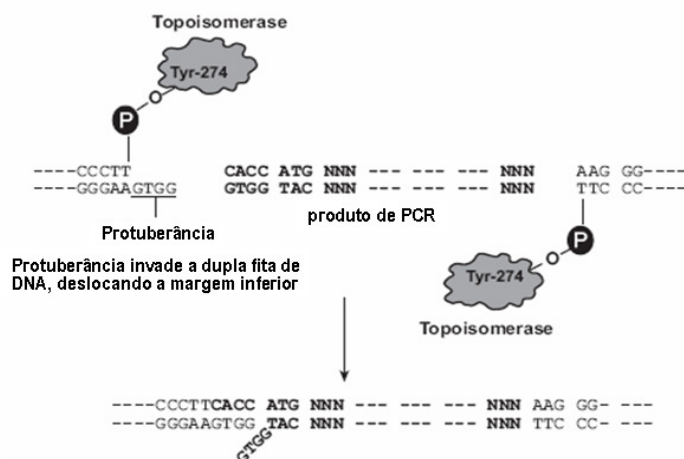


FIGURA 3 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PROCESSO DE CLONAGEM EM pENTR™/D-TOPO®. NESTE SISTEMA, OS PRODUTOS DA PCR SÃO DIRECIONALMENTE CLONADOS PELA ADIÇÃO DE QUATRO BASES NO OLIGONUCLEOTÍDEO "FORWARD" (CACC). A PROTUBERÂNCIA DO VETOR DE CLONAGEM (GTGG) INVADE A EXTREMIDADE 5' DO PRODUTO DE PCR, SE ANELA À REGIÃO CACC E ESTABILIZA O PRODUTO DE PCR NA ORIENTAÇÃO CORRETA. ESTA REAÇÃO É POSSÍVEL DEVIDO À ENZIMA TOPOISOMERASE, QUE CLIVA A LIGAÇÃO FOSFODIÉSTER DE UMA FITA E CONSERVA ENERGIA PELA FORMAÇÃO DE UMA LIGAÇÃO COVALENTE ENTRE O FOSFATO 3' DA FITA CLIVADA E UM RESÍDUO DE TIROSIL DA TOPOISOMERASE. ESSA LIGAÇÃO FOSFO-TIROSIL PODE SER ATACADA PELA FITA CLIVADA ORIGINAL, REVERTENDO A REAÇÃO E LIBERANDO A TOPOISOMERASE

MODIFICADO DE: <http://www.invitrogen.com>

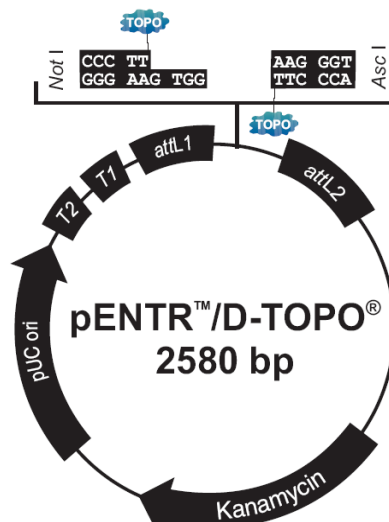


FIGURA 4 - MAPA DO VETOR pENTR™/D-TOPO®. TOPO: ENZIMA TOPOISOMERASE I; **attL1** E **attL2**: SEQUÊNCIAS QUE PERMITEM A RECOMBINAÇÃO ESPECÍFICA DO GENE DE INTERESSE PARA O VETOR DE EXPRESSÃO DA PLATAFORMA GATEWAY®; **KANAMYCIN**: GENE DE RESISTÊNCIA AO ANTIBIÓTICO CANAMICINA; **pUC ori**: ORIGEM PARA ALTA TAXA DE REPLICAÇÃO E MANUTENÇÃO DO PLASMÍDEO EM *E. coli*; **T1** E **T2**: SEQUÊNCIAS DE TÉRMINO DE TRANSCRIÇÃO; **Not I** E **Asc I**: SÍTIOS PARA ENDONUCLEASES.

FONTE: <http://www.invitrogen.com>

A quantidade do produto da PCR a ser colocada na reação seguiu a proporção vetor/inserto de 1:1 moléculas, (o vetor contém 2580 pb e vem em solução com concentração de 20 ng/μl; a concentração do produto de PCR era dosado por espectrofotometria e a conversão para moléculas tomava por base seu tamanho). A reação de clonagem consistiu na adição do produto da PCR a 1 μl de solução salina (incluída no *kit* de clonagem pENTR™ Directional TOPO®), 1 μl de vetor pENTR™/D-TOPO® e água ultra-pura para completar o volume final de 6 μl. As amostras foram incubadas em temperatura ambiente (25 °C) por 30 minutos.

3.8 TRANSFORMAÇÃO DAS CÉLULAS CÁLCIO-COMPETENTES COM O VETOR

A transformação consistiu na adição de 2 μl da reação em frascos de bactérias *E. coli* cepa Mach1 (pertencente ao *kit* de clonagem pENTR™ Directional TOPO®) e misturados gentilmente. Cada frasco era deixado por 30 minutos no gelo, 2 minutos em 42 °C e novamente no gelo. Era adicionado 250 μl de meio LB, e os

frascos eram incubados a 37 °C com agitação de 200 rpm por 1 hora. As bactérias eram cultivadas em placas seletivas contendo meio LB-ágar com 25 µg/ml de antibiótico canamicina. Para garantir que houvesse uma densidade de colônias adequada, o conteúdo era dividido em duas placas com o meio sólido, de forma que em uma placa era cultivado 50 µl da amostra, e na outra era cultivado 200 µl. As placas eram incubadas durante a noite a 37 °C.

3.9 SELEÇÃO DE COLÔNIAS POSITIVAS POR PCR DE COLÔNIA OU POR *TOOTHPICK*

Para verificação de quais colônias possuíam o vetor com o inserto, duas técnicas foram usadas: PCR de colônia ou *toothpick*.

3.9.1 Seleção de colônias positivas por PCR de colônia

A PCR de colônia consiste em uma reação de PCR onde não se usa o DNA purificado, e sim o DNA não-purificado presente nas colônias das bactérias.

A reação era realizada com Tampão *Taq* 1X, MgCl₂ 1,5 mM, 0,2 µM de cada iniciador, 0,25 mM de desoxirribonucleotídeos e 0,5 U de *Taq* DNA polimerase para um volume final de 25 µl. Com um palito estéril, uma colônia aleatória era retirada da placa onde as bactérias foram cultivadas e este palito era encostado em outra placa de Petri contendo meio LB-ágar com 25 µg/ml de antibiótico canamicina para fazer uma placa referência (onde se sabe o local exato de cada colônia específica). O mesmo palito era inserido no tubo de PCR, com os reagentes para PCR, para liberação de algumas células. O programa da PCR era o mesmo utilizado na PCR que se obteve a amplificação específica do gene, a partir do DNA genômico, exceto nos casos onde, para colocar diferentes amostras em um mesmo termociclador, era

utilizado o maior tempo de extensão, e a menor temperatura de anelamento, visando a amplificação de todos os genes.

As amostras eram submetidas a eletroforese em gel de agarose conforme item 3.6. As colônias consideradas positivas eram retiradas da placa referência e colocadas em 2 ml de meio LB líquido contendo 25 µg/ ml de antibiótico canamicina e incubadas a 37°C durante a noite com agitação para fazer a extração do DNA plasmidial conforme o item 3.10.

3.9.2 Seleção de colônias positivas por *toothpick*

Com palitos estéreis, algumas colônias eram removidas da placa e espalhadas no fundo de um tubo de polipropileno de 1,5 ml, ao mesmo tempo em que era feito uma placa referência. Nos tubos com células bacterianas, eram adicionados 10 µl de tampão de lise para *toothpick*. Os tubos eram agitados e incubados a 65°C por 10 minutos. As amostras eram aplicadas em gel de agarose 0,8%, que não poderia estar totalmente submerso em TBE 1X, e era aplicada uma diferença de potencial de 100 V. Cinco minutos após o início da corrida eletroforética, adicionava-se tampão TBE 1X para que o gel fosse totalmente coberto com o tampão. O gel era corado e observado da mesma maneira que o item 3.6. As colônias consideradas positivas eram retiradas da placa referência e colocadas em 2 ml de meio LB líquido contendo 25 µg/ml de antibiótico canamicina e incubadas a 37°C durante a noite com agitação para fazer extração de DNA plasmidial conforme o item 3.10.

3.10 EXTRAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL (MINIPREP)

Os 2 ml de cultura provenientes dos itens 3.9.1 e 3.9.2 eram centrifugados a 13.000 g por 3 minutos para obtenção do sedimentado bacteriano. A miniprep era

feita utilizando o *kit* QIAprep Spin Miniprep (Qiagen), seguindo as recomendações do fabricante. Para visualização do vetor contendo o inserto, 2 µl da solução de plasmídeo eram submetidos a eletroforese em gel de agarose 0,8%, conforme o item 3.6. A concentração da solução de plasmídeo era estimada utilizando o espectrofotômetro GeneQuant (Pharmacia).

3.10.1 PCR de plasmídeo

Para confirmar se o vetor estava com o inserto correto, era feito uma PCR a partir do plasmídeo purificado. As PCRs eram feitas com 1 µl da solução contendo o plasmídeo diluído 50 vezes em tampão *Taq* 1X, MgCl₂ 1,5 mM, 0,25 mM de desoxirribonucleotídeos, 0,2 µM de cada iniciador e 0,5 U de *Taq* DNA Polimerase em um volume final de 25 µl. As amostras eram colocadas no termociclador com programa de 94°C por 5 minutos, 25 ciclos de 94°C por 45 segundos, 55°C (ou a temperatura ideal utilizada na primeira PCR) por 45 segundos e 72°C por um tempo de 1 minuto para cada mil pares de bases. Terminada as repetições, as amostras ficavam por 10 minutos em 72°C.

As amostras eram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1% conforme item 3.6.

3.11 RECOMBINAÇÃO NO VETOR DE EXPRESSÃO PDEST™17

Gateway® LR Clonase™ II enzyme mix (Invitrogen) catalisa *in vitro* a recombinação entre um clone em pENTR para pDEST, e neste caso foi utilizado o pDEST™17 (figura 5). O gene foi inserido entre os fragmentos attR1 e attR2 do pDEST.

O vetor pDEST™17 é um vetor de fusão N-terminal e contém um códon de início, ATG, a montante da etiqueta de seis histidinas. Uma sequência *Shine-*

Dalgarno é incluída a montante do códon de início ATG para garantir espaçamento ótimo para o início da tradução em *E. coli*.

Para a reação de recombinação, 100 ng de plasmídeo pENTR purificado era colocado em uma solução contendo 1 µl de pDEST, 2 µl de enzima (LR Clonase™ II, inclusa no *kit* Gateway® LR Clonase™ II enzyme mix) e solução TE para volume final de 10 µl. A solução era incubada por 3 horas em temperatura ambiente (25°C). Para parar a reação, era adicionado 1 µl de proteinase K e incubado por 10 minutos a 37°C.

A transformação era feita do mesmo modo que no item 3.8, porém, era utilizada a bactéria *E. coli* cepa DH5-α e o conteúdo era cultivado em placa com meio LB-ágar com 100 µg/ml de antibiótico ampicilina. As placas eram incubadas a 37°C durante a noite e fazia-se um inóculo para extração do plasmídeo, conforme descrito no item 3.10, e em seguida, PCR da solução de plasmídeos para verificação da presença do inserto.

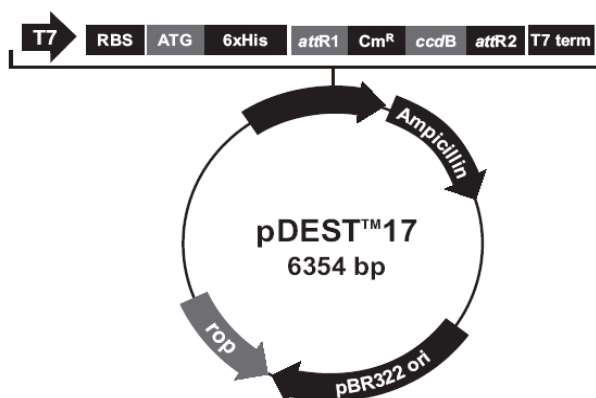


FIGURA 5 - MAPA DO VETOR pDEST™17. **T7**: PROMOTOR PARA T7 RNA POLIMERASE; **RBS**: SEQUÊNCIA SHINE-DALGARNO; **ATG**: CÓDON DE INÍCIO DA TRADUÇÃO; **6XHIS**: REGIÃO CODIFICADORA DE SEIS HISTIDINAS; **attR1 E attR2**: SEQUÊNCIAS DE RECOMBINAÇÃO DERIVADAS DO BACTERIÓFAGO λ QUE PERMITE A RECOMBINAÇÃO DO GENE NO VETOR; **Cm^R**: GENE DE RESISTÊNCIA AO CLORANFENICOL PARA CONTRA-SELEÇÃO DO PLASMÍDEO; **ccdB**: GENE QUE CODIFICA UMA PROTEÍNA CITOTÓXICA, SENDO LETAL PARA A BACTÉRIA, O QUE EVITA QUE CRESÇAM COLÔNIAS COM pDEST SEM O GENE DE INTERESSE; **T7 TERM**: SEQUÊNCIA QUE PERMITE O TÉRMINO DA TRANSCRIÇÃO; **AMPICILLIN**: GENE DE RESISTÊNCIA AO ANTIBIÓTICO AMPICILINA; **pBR322 ori**: ORIGEM DA REPLICAÇÃO PARA DUPLICAÇÃO DO DNA E MANUTENÇÃO DO PLASMÍDEO; **ROP**: INTERAGE COM A ORIGEM PBR322 PARA FACILITAR A BAIXA TAXA DE REPLICAÇÃO EM *E. coli*

FONTE: <http://www.invitrogen.com>

3.12 SEQÜENCIAMENTO DAS EXTREMIDADES DOS INSERTOS

Para a verificação de que o fragmento inserido era o gene de interesse e para confirmação de que ele estava completo, as duas extremidades de cada gene foram seqüenciadas no seqüenciador *ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer* (*Applied Biosystems*), utilizando o *kit BigDye® Terminator v3.1*, para posterior comparação com a seqüência disponível no banco de dados. As seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores para o seqüenciamento dos genes inseridos no vetor pDEST™17 estão descritas abaixo:

- pDEST 17-F: 5'-AATACGACTCACTATAGGGAGACC-3';
- pDEST 17-R: 5'-TTCCTTTCGGGCTTTGTTAGCAGCC-3'.

A comparação da seqüência obtida com o banco de dados se realizou através de uma ferramenta para a pesquisa básica de alinhamento local (*BLAST*), disponível no sítio <http://www.genedb.org.br>, que procura seqüências nucleotídicas baseadas em homologia à seqüência obtida no seqüenciamento.

3.13 CULTIVO DO *T. cruzi* E OBTENÇÃO DAS DIFERENTES FORMAS DO CICLO DE VIDA PARA OBTENÇÃO DE EXTRATO PROTÉICO DO *T. cruzi*

Foi utilizado o clone Dm28c (*Didelphis marsupialis*) de *T. cruzi* (Contreras *et al.*, 1985; Contreras *et al.*, 1988). As formas epimastigotas foram mantidas em cultura axênica a 28 °C em meio LIT-B (CAMARGO, 1964), repicadas a cada três dias mediante inóculos de 1×10^6 células/ml.

Formas tripomastigotas metacíclicas foram obtidas segundo Bonaldo *et al.* (1988). Resumidamente, formas epimastigotas em final de fase logarítmica de crescimento (aproximadamente 5 dias) foram submetidas a estresse nutricional ao serem mantidas em meio TAU a 28°C por 2 horas. Após este período, os parasitas foram cultivados por 96 horas em meio TAU acrescido de três aminoácidos (ácido aspártico, ácido glutâmico e prolina) e glicose a 28°C. Durante este período, os parasitas aderiram-se ao fundo das garrafas de cultivo (de onde foram extraídos os

extratos chamados de aderidos 3, 6, 12 18 e 24 horas) e se diferenciaram nas formas tripomastigotas metacíclicas, soltando-se do substrato. Os tripomastigotas do sobrenadante da cultura foram purificados por cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE celulose (SOUZA, 1984).

Formas amastigotas e tripomastigotas de cultura celular foram obtidas após a infecção de células Vero por tripomastigotas. As células Vero foram cultivadas em garrafas de 150 cm² meio RPMI suplementado com 5% de soro fetal bovino, 25 µg/ml de gentamicina 0,1 mM de aminoácido L-glutamina, a 37 °C com 5% de CO₂, até uma confluência de aproximadamente 60%, quando foi realizada a infecção. O inóculo foi de 10⁶-10⁷ tripomastigotas por garrafa. Após 3 a 4 dias, tripomastigotas de cultura celular romperam as células e puderam ser coletados. A partir deste momento, o sobrenadante da cultura foi recolhido diariamente e a proporção tripomastigota:amastigota foi determinada. Amostras de tripomastigotas de cultura celular deveriam estar pelo menos com 90% de pureza. Amostras de amastigotas, para o mesmo fim, deveriam estar com mais que 80% de pureza. Amostras com purezas intermediárias puderam ser utilizadas tanto em ensaios de imunolocalização como para re-infectar novas células Vero.

Para a obtenção dos extratos protéicos de *T. cruzi*, as diferentes células isoladas durante as diferentes fases do ciclo de vida, assim como durante o processo de metaciclogênese, foram centrifugadas a 7.000 g, por 5 minutos, a 4°C, lavadas três vezes com PBS 1X, ressuspensas em PBS 1X e adicionado tampão de amostra para concentração final 1X, e foram fervidas por 5 minutos. Após 5 minutos no gelo, foram novamente centrifugadas por 5 minutos a 10.000 g (SAMBROOK et al, 1989).

3.14 EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Para a expressão das proteínas recombinantes, era feita a transformação do plasmídeo pDESTTM17 na bactéria cálcio-competente *E. coli* BL21(DE3)pLysS, e indução da expressão com IPTG. A designação DE3 significa que a bactéria contém o fago λ lisogênico que carrega o gene para a T7 RNA polimerase sob controle do

promotor *lacUV5*. Sem indução, a T7 RNA polimerase não é transcrita. Para induzir a expressão, é adicionada uma solução de IPTG. O indutor IPTG é uma molécula que mimetiza a alolactose e liga-se ao repressor do operon *lacUV5*, permitindo a ligação da RNA polimerase bacteriana com o promotor *lac*, havendo síntese de T7 RNA polimerase que se liga no promotor do pDEST e promove expressão do gene inserido no vetor. O plasmídeo pLysS, contido na bactéria, dá resistência ao antibiótico cloranfenicol e também produz lisozima T7, uma proteína que se liga à T7 RNA polimerase e inibe a atividade desta polimerase, inibindo a expressão basal do inserto.

3.14.1 Teste de expressão das proteínas recombinantes

Para a verificação de que o gene clonado era capaz de expressar uma proteína, era feito o teste de expressão, que consiste na transformação do plasmídeo pDEST™17 na bactéria cálcio-competente *E. coli* BL21(DE3)pLysS, e indução da expressão com IPTG em um pequeno volume de meio de cultura.

Era feita a transformação da mesma forma que o item 3.8, com a diferença de que era adicionado 1 ml de meio de cultura LB, e as células eram transferidas para meio de cultura LB com os antibióticos ampicilina 100 µg/ml e cloranfenicol 25 µg/ml. As células ficavam nesse meio de cultura sob agitação de 200 rpm a 37°C por 16 horas (pré-inóculo).

Para induzir a expressão, era feita uma diluição 1:10, com volume final de 5 ml, a partir do pré-inóculo para novo meio de cultura LB com antibióticos (ampicilina 100 µg/ml e cloranfenicol 25 µg/ml) e as células cresciam a 37°C sob rotação de 200 rpm até DO₆₀₀ entre 0,6 e 0,8 (aproximadamente 2 horas), quando era adicionado IPTG para concentração final 1 mM. O tempo de indução era de 2 horas. A cultura era centrifugada a 5.000 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante era descartado e as células ressuspensas em tampão PBS 1X no mesmo volume de cultura em que foi expresso e era novamente centrifugado a 5.000 g por 10 minutos a 4°C. As células eram ressuspensas em 120 µl de tampão de amostra 4X e aplicadas em gel de poliacrilamida para eletroforese (item 3.15).

Quando havia dúvida sobre a expressão, era feito *western-blot* para detecção da proteína recombinante com o anticorpo anti-histidina (vide item 3.16), que reconhece a cauda de histidina, uma vez que o plasmídeo de expressão promove a produção da proteína de interesse fusionada a uma cauda de seis histidinas. Quando não ocorreu expressão da proteína, seus estudos foram interrompidos.

3.14.2 Preparação de extrato de proteínas da bactéria *E. coli* BL21(DE3)pLysS

Para a preparação do extrato de proteínas da bactéria, que serviu como controle negativo para comparação com o extrato protéico bacteriano das culturas induzidas, foram adicionados 50 µl de células BL21(DE3)pLysS em 1 ml de meio de cultura LB e as células cresceram a 37°C sob agitação com rotação de 200 rpm por aproximadamente 15 horas. Foi feita a transferência de 100 µl da cultura para 1 ml de meio de cultura LB e crescimento até $DO_{600} = 0,8$. A cultura foi centrifugada a 5.000 g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartado. As células foram ressuspensas em tampão de sonicação e sonicadas 4 pulsos de 15 segundos à potência 4, com intervalo de 1 minuto entre cada pulso. Foi adicionado tampão de amostra 4X (concentração final 1X), sendo o extrato agitado, fervido por 10 minutos, colocado no gelo por 5 minutos e centrifugado a 16.000 g por 10 minutos.

3.14.3 Produção em larga escala das proteínas recombinantes

Para a expressão em grande quantidade, fazia-se um pré-inóculo da mesma forma que no item 3.14.1, mas em volume final de 30 ml para que, após a diluição 1:10, houvesse 300 ml de cultura para fazer a indução.

Antes da adição de IPTG, era retirado 2 ml de meio de cultura para ter o controle da proteína não induzida. Após a indução, a cultura era centrifugada a

5.000 g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante era descartado. As células eram ressuspensas em PBS no mesmo volume de cultura em que foi expresso e centrifugava-se novamente a 5.000 g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante era descartado (este procedimento era repetido duas vezes).

Proteínas eucarióticas expressas intracelularmente em *E. coli* são freqüentemente seqüestradas em corpúsculos de inclusão insolúveis, provavelmente causados pela associação intermolecular de domínios hidrofóbicos durante o enovelamento (www.invitrogen.com). As proteínas presentes nos corpúsculos de inclusão são insolúveis e podem ser separadas das proteínas solúveis, as demais proteínas presentes nas células. Após a obtenção do extrato protéico total, esta solução pode ser centrifugada e as proteínas solúveis permanecerão em solução, enquanto as proteínas insolúveis deverão formar um precipitado. Este precipitado pode ser solubilizado em tampão contendo uréia, um forte agente desnaturante.

Sendo assim, as células não induzidas eram ressuspensas em 120 µl de tampão de amostra 4X. As células induzidas eram ressuspensas em 9 ml de tampão de sonicação e sonicadas 4 pulsos de 15 segundos a potência 8, com intervalo de 1 minuto entre cada pulso. Era retirado 75 µl e, a essa alíquota, eram adicionado 25 µl de tampão de amostra 4X. Essa amostra correspondia à 'fração total', isto é, possuía todas as proteínas presentes na bactéria. O restante era centrifugado a 10.000 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante era transferido para um tubo limpo, onde era armazenado. Do sobrenadante, eram retirados 75 µl e era adicionado 25 µl de tampão de amostra 4X. Essa amostra correspondia à 'fração solúvel', isto é, possuía apenas as proteínas solúveis da bactéria. O sedimento era ressuspensado em 9 ml de tampão com uréia 2 M, sonicado novamente com 4 pulsos de 15 segundos a potência 8, com intervalo de 1 minuto entre cada pulso e centrifugado a 10.000 g por 10 minutos e o sobrenadante era armazenado. A ressuspensão em tampão com uréia 2 M era repetido por mais duas vezes para eliminação das impurezas e, de cada sobrenadante eram retirados 75 µl e adicionado 25 µl de tampão de amostra 4X, correspondentes às 'primeira, segunda e terceira passagens por tampão de uréia 2 M'. O sedimento era ressuspensado em 9 ml de tampão com uréia 8 M, sonicado 4 pulsos de 15 segundos a potência 8, com intervalo de 1 minuto entre cada pulso e centrifugado a 10.000 g por 10 minutos e o sobrenadante era armazenado. Do sobrenadante, eram retirados 75 µl e adicionados 25 µl de tampão de amostra 4X, que correspondia à 'fração insolúvel'.

Todas as amostras eram agitadas e apenas as amostras ‘não induzida’, ‘fração total’ e ‘fração solúvel’ eram fervidas por 5 minutos e em seguida colocadas no gelo, e depois todas as amostras eram centrifugadas por 1 minuto a 16.000 g e então submetidas à eletroforese, como descrito no item 3.16. Quando a expressão não era clara, era feito *western-blot* para detecção da proteína recombinante com anticorpo anti-histidina, como o descrito no item 3.16. De acordo com o resultado obtido no resultado da eletroforese e do *western-blot*, a proteína expressa era purificada, era repetida a expressão com outras condições ou os estudos para essa proteína eram interrompidos

3.15 ELETROFORESE DE PROTEÍNA EM GEL DE POLIACRILAMIDA DESNATURANTE (SDS-PAGE)

A concentração de acrilamida para o gel variava conforme o peso molecular da proteína, sendo que as concentrações mais utilizadas eram: 8% para proteínas de alto peso molecular (acima de 100 kDa), 10% para proteínas entre 50 e 100 kDa, 13% para proteínas entre 25 e 60 kDa e 15% para proteínas de baixo peso molecular (abaixo de 25 kDa).

As amostras que estavam em tampão de amostra 4X eram agitadas vigorosamente, fervidas por 5 minutos, colocadas no gelo e centrifugadas por 1 minuto a 16.000 g.

No gel, aplicava-se 5 µl de marcador de peso molecular *PageRuler™* ou *BenchMark™*, entre 5 e 10 µl (conforme a concentração) de extrato de proteínas da bactéria *E. coli* BL21(DE3)pLysS para ser usada como controle negativo e 9 µl do extrato protéico bacteriano da cultura induzida. O gel era imerso em tampão de corrida *SDS-page* e, depois de aproximadamente 1 hora e 30 minutos, sob amperagem de 30 mA, o gel era colocado para corar em solução de azul de coomassie por aproximadamente 40 minutos e era transferido para solução de descoloração para a retirada do corante excedente, permitindo a visualização dos extratos em forma de bandas.

3.16 WESTERN-BLOT

Era feita uma eletroforese em gel de poliacrilamida (item 3.15), entretanto, não se corava o gel e as proteínas eram transferidas do gel para uma membrana de nitrocelulose. Era preparado o sistema para a transferência, onde uma membrana era colocada sobre o gel de poliacrilamida, e o sistema era imerso em tampão de transferência em uma cuba apropriada. Aplicava-se uma corrente elétrica entre grandes placas de cada lado da cuba e as proteínas carregadas se moviam do gel para a membrana enquanto mantinham a mesma disposição que continham no gel. Após aproximadamente 1 hora e 30 minutos de transferência a 100 V (algumas vezes a transferência era realizada durante a noite a 20 V), a membrana era retirada e colocada em solução de *Ponceau S* para coloração reversível das proteínas transferidas. A canaleta com o marcador era recortada e guardada para posterior comparação com o resultado das canaletas contendo as proteínas recombinantes. A membrana era lavada com água filtrada para remoção do *Ponceau S* e colocada em solução de bloqueio 5%, durante 1 hora, sendo que em algumas vezes, a incubação durante a noite a 4°C.

Após três lavagens de 5 minutos com TBS-Tween 0,1%, era preparada a solução com anticorpo primário (solução com anticorpo anti-histidina) diluída 1/3.000 em solução de bloqueio 5%. Após 1 hora de incubação da membrana em solução com anticorpo primário, eram feitas três lavagens de 5 minutos com TBS-Tween 0,1% e preparada a solução com anticorpo secundário (solução com anticorpo anti-*mouse* conjugado à enzima fosfatase alcalina) diluído 1/10.000 em solução de bloqueio. Após 1 hora em solução com anticorpo secundário, eram feitas três lavagens de 5 minutos com TBS-Tween 0,1%. A solução de revelação era preparada com 10 ml de tampão de revelação para fosfatase alcalina, 33 µl BCIP e 66 µl NBT e a membrana era colocada para revelar, no escuro, por aproximadamente 5 minutos. BCIP se liga ao sítio ativo da fosfatase alcalina e, quando o NBT reage com o BCIP em uma reação de oxido-redução, BCIP se solta da enzima e o precipitado colorido se forma. Quando as bandas apareciam, a membrana era colocada em água destilada com EDTA para parar a reação.

3.17 PURIFICAÇÃO ATRAVÉS DE GEL PREPARATIVO

Um gel de poliacrilamida com volume de 50 ml era preparado e colocado em uma cuba de eletroforese própria para o gel preparativo. Eram aplicados 3 ml da proteína com 1 ml de tampão de amostra 4X. O gel era submerso no tampão de eletroforese *SDS-page* e depois de aproximadamente 15 horas sob amperagem de 30 mA, o gel era retirado e colocado em solução de KCl 0,1 M gelado. Com um estilete, a banda mais espessa era cortada do gel, pois era a que representava a proteína expressa. Esse pedaço de gel era colocado em um saco de diálise, juntamente com aproximadamente 2 ml de tampão de corrida *SDS-page* para remover a proteína do gel.

O saco de diálise era colocado em uma cuba de eletroforese horizontal, em sentido transversal, com tampão de corrida *SDS-page* e ficava sob voltagem 60 V por 2 horas. Os pólos da cuba eram invertidos, permanecendo por mais 5 minutos sob voltagem 60 V. Dentro do saco de diálise restava o gel sem as proteínas, que ficava em solução. A solução era retirada do saco de diálise e armazenada.

3.17.1 Quantificação da proteína purificada

Para a quantificação das proteínas purificadas, foi utilizado o Qubit™ Fluorometer (Invitrogen), conforme orientações do fabricante. A plataforma de quantificação do Qubit utiliza corantes fluorescentes específicos para DNA, RNA ou proteínas, evitando a contaminação por outras macromoléculas.

3.18 INOCULAÇÕES EM CAMUNDONGOS

Para a produção de anticorpos, as proteínas recombinantes foram inoculadas em camundongos da linhagem Suíço. A escolha para o sexo dos camundongos utilizados foi arbitrária, bastava que fossem todos do mesmo sexo e que tivessem mais de 40 dias de vida. Antes das inoculações, era coletado sangue para obtenção de soro antes da produção de anticorpos (pré-imune) para ver se não havia possibilidade de ocorrer ligação-cruzada entre os anticorpos do camundongo e a proteína recombinante.

3.18.1 Avaliação dos anticorpos presentes no soro pré-imune

Esta avaliação consiste na verificação da presença de anticorpos no soro dos camundongos não imunizados, que possam estar reconhecendo algum epitopo da proteína recombinante, através de uma reação inespecífica. Foi retirado aproximadamente 100 µl de sangue da cauda dos camundongos antes das imunizações. O sangue foi incubado a 37°C por 45 minutos e centrifugado por 10 minutos a 16.000 g para a obtenção do soro.

Em um gel de poliacrilamida, aplicava-se 5 µl do marcador *PageRuler™* ou *BenchMark™*, e extrato de proteínas do *T. cruzi* proveniente de 10⁷ células. As proteínas eram transferidas para membrana de nitrocelulose sendo feita a detecção das proteínas da mesma maneira que descrito no item 3.16, com a diferença que o anticorpo primário utilizado foi o soro do camundongo diluído 1/250. Em comparação com o padrão de bandas do marcador, era verificado se havia alguma banda do tamanho da proteína recombinante. Caso negativo, o camundongo era utilizado para as inoculações, sendo que, dois camundongos eram utilizados para cada proteína.

3.18.2 Inoculações das proteínas purificadas em camundongos

Para a primeira inoculação em cada camundongo, foi preparada uma solução com 40 µg da proteína purificada, 200 µl de adjuvante completo de Freund e solução salina 0,9% para volume final de 400 µl, quantidade suficiente para inoculação em dois camundongos. As injeções eram feitas na região intra-peritoneal dos camundongos e foram repetidas a cada 14 dias. Para as segunda, terceira e quarta injeções, eram preparados 40 µg da proteína purificada, 77 µl de hidróxido de alumínio (Alu-Gel-S) e quantidade suficiente de solução salina 0,9% para 400 µl. Sete dias após a quarta inoculação, retirava-se aproximadamente 250 µl de sangue da cauda dos camundongos para verificar se houve produção de anticorpos contra a proteína inoculada. Caso a quantidade de anticorpos produzidos tivesse sido pequena, as inoculações eram repetidas da mesma forma e no mesmo intervalo de tempo.

3.18.3 Verificação da produção de anticorpos contra a proteína recombinante

Em um gel de poliacrilamida, aplicava-se 5 µl do marcador *PageRuler™* ou *BenchMark™*, 5 µg da proteína purificada, de 5 a 10 µl do extrato de proteínas da bactéria *E. coli* BL21(DE3)pLysS e extrato de proteínas do *T. cruzi* na forma epimastigota e tripomastigota metacíclico, provenientes de 10^7 células. As proteínas eram transferidas para membrana de nitrocelulose, sendo feita a detecção da mesma maneira que no teste pré-imune, descrito no item 3.18.1. Caso o resultado fosse positivo, isto é, mostrasse a presença de anticorpos contra a proteína no extrato do *T. cruzi*, os animais eram sedados com quetamina e anestesiados com xilazina e o sangue obtido por punção cardíaca.

3.19 IMUNOENSAIOS

Os anticorpos produzidos pelos camundongos foram utilizados em ensaios do tipo *western-blot*, para comparar a quantidade da proteína expressa nas diferentes fases do ciclo de vida do *T. cruzi*, assim como durante a metaciclogênese, e para imunolocalização celular, utilizando a imunofluorescência.

3.19.1 Purificação dos anticorpos

Caso o resultado da detecção dos anticorpos contra as proteínas do extrato de *T. cruzi* mostrasse o aparecimento de bandas de outros tamanhos além da banda de tamanho correto para a proteína, provavelmente resultado de ligações cruzadas, o soro deveria ser purificado para a presença apenas de anticorpos específicos.

Para a purificação dos anticorpos, era feito eletroforese em gel de poliacrilamida com 70 a 100 µg da proteína purificada, que era transferida para a membrana de nitrocelulose. Após ser corada com *Ponceau S*, a membrana era recortada de modo que apenas a região da membrana contendo a proteína fosse colocada para bloquear em solução de bloqueio 5% por uma hora. Após três lavagens de cinco minutos com TBS-Tween 0,1%, a membrana era colocada para incubar em solução contendo o soro do camundongo com aproximadamente 20 µl do extrato de proteínas da bactéria *E. coli* BL21(DE3)pLysS. Após duas horas sob agitação, a membrana era lavada com TBS-Tween por mais duas vezes de cinco minutos. A membrana era então colocada em um recipiente com 500 µl de glicina 0,2 M pH 2,5, que era agitado manualmente por dois minutos. A solução de glicina com os anticorpos eluídos era retirada deste recipiente e colocada em outro, com 50 µl de Tris base 1 M pH 9,5 para neutralizar a solução. Para evitar a formação de complexos entre os anticorpos, adicionava-se 5 µl de BSA.

3.19.2 *Western-Blot* competitivo

Em um gel de poliacrilamida, aplicava-se 5 µl do marcador *PageRuler™* ou *BenchMark™* e extrato de proteínas do *T. cruzi* na forma epimastigota, proveniente de 10^7 células. As proteínas eram transferidas para membrana de nitrocelulose e era feita a detecção de forma como o descrito no item 3.18.1, com a diferença de que era adicionada a proteína recombinante purificada, na diluição 1:50, juntamente com o soro do camundongo, correspondente ao anticorpo primário. A proteína adicionada tinha o objetivo de capturar os anticorpos presentes no soro dos camundongos, pois, estando em maior quantidade, os anticorpos se ligariam preferencialmente à proteína recombinante do que à proteína nativa presente no extrato do *T. cruzi*. Sendo assim, o resultado esperado após a revelação era o não aparecimento da banda equivalente ao tamanho da proteína nativa no extrato do *T. cruzi*. Caso o resultado fosse positivo, podia-se dizer que os anticorpos produzidos pelos camundongos eram específicos contra a proteína de interesse, e assim, poderiam ser utilizados para os imunoenaios.

3.19.3 *Western-Blot* e detecção da proteína em extratos protéicos de *T. cruzi* em diferentes etapas do ciclo de vida

Após a quantificação das proteínas nos extratos das diferentes fases durante a metaciclogênese, foi calculado um volume para cada amostra para que a quantidade de proteínas aplicada fosse 5 µg para todos os extratos. Em um gel de poliacrilamida, eram aplicados 5 µl do marcador *PageRuler™* ou *BenchMark™*, e o volume calculado para cada extrato de proteínas do *T. cruzi*. As proteínas eram transferidas para membrana de nitrocelulose para detecção das proteínas utilizando o soro dos camundongos como anticorpo primário. Após a incubação da membrana com o anticorpo secundário conjugado à fosfatase alcalina, era feita a revelação e as amostras eram comparadas para verificação da quantidade de proteína expressa em cada fase. Este resultado era comparado com os resultados obtidos por

microarranjo, para comparar a quantidade de mRNA transcrito com a quantidade de proteína traduzida.

3.19.4 Imunofluorescência para identificação da localização celular

Em uma lâmina própria, os parasitas eram aderidos utilizando solução de poli-L-lisina e fixados com paraformaldeído 4%. Eram aplicados 20 µl de cloreto de amônio 50 mM em PBS 1X sobre a lâmina para bloquear a passagem de elétrons no anel aromático do paraformaldeído, que pode gerar fluorescência. Era aplicado Triton 0,1% em PBS 1X para permeabilizar a membrana dos parasitas, e em seguida a lâmina era bloqueada com soro de cabra 25% em PBS 1X. O soro dos camundongos utilizado no teste pré-imune, assim como o soro com os anticorpos eram diluídos em soro de cabra 25% em PBS 1X e colocados na lâmina para incubar por 1 hora a 37°C. Após duas lavagens com PBS 1X, o anticorpo secundário anti-*mouse* conjugado ao fluoróforo Alexa 488 era diluído 1:500 em soro de cabra 25% em PBS 1X e era colocado na lâmina para incubar por 1 hora a 37°C. A solução de DAPI era diluída na proporção 1:1.000, aplicado na lâmina e incubado por 10 minutos a temperatura ambiente. Após três lavagens de 5 minutos com PBS 1X, a lâmina era seca, colocando-se em seguida uma gota de N-propil-galato em cada poço, e sobre, a lâmina era colocada uma lamínula que era selada com esmalte.

As lâminas eram observadas no microscópio Nikon, as imagens eram capturadas usando a câmara CoolSnap (Media Cybernetics) para então serem analisadas com o programa Image Pro-Plus v. 4.5.1.22 (Media Cybernetics).

3.20 TRANSFEÇÃO EM *T. cruzi* COM O GENE INSERIDO NO VETOR pTcPR-GFPN

3.20.1 Clonagem do gene para o vetor pTcPR-GFPN

O vetor pTcPR-GFPN foi desenvolvido pelo nosso grupo, em uma dissertação de mestrado (BATISTA, 2008), e contém o gene para a proteína fluorescente verde (GFP), que é expressa fusionada à proteína de interesse.

Assim como o vetor de expressão em *E. coli* pDEST™17, o vetor pTcPR-GFPN contém os sítios *attR1* e *attR2* para recombinação com os sítios *attL1* e *attL2* presentes no vetor de entrada. O vetor pTcPR-GFPN foi derivado do vetor pTcPR-HisN (figura 6), com substituição da sequência N-terminal das seis histidinas pelo gene da proteína GFP.

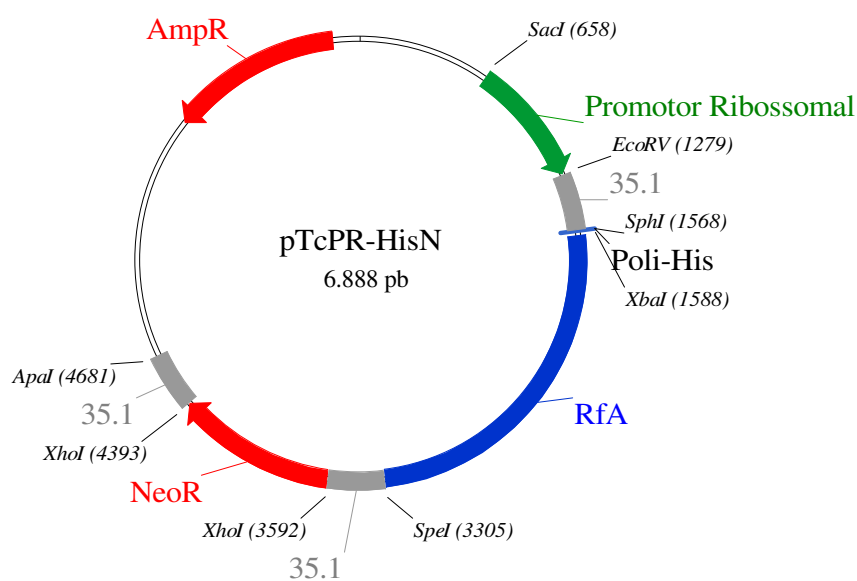


FIGURA 6 - DESENHO ESQUEMÁTICO DO VETOR pTcPR-HisN. EM ITÁLICO ESTÃO DESTACADOS OS SÍTIOS PARA ENDONUCLEASES DE RESTRIÇÃO. **35.1**: REGIÕES INTERGÊNICAS; **POLI-HIS**: SEQÜÊNCIA PARA ETIQUETA DE SEIS HISTIDINAS; **RfA**: CASSETE DE CONVERSÃO PARA A PLATAFORMA GATEWAY®, ONDE ESTÃO PRESENTES AS SEQÜÊNCIAS *attR1* E *attR2*; **AMP^R**: GENE DE RESISTÊNCIA À AMPICILINA, PARA SELEÇÃO DE BACTÉRIAS POSITIVAS; **NEO^R**: GENE DE RESISTÊNCIA À NEOMICINA PARA SELEÇÃO DE TRIPANOSSOMATÍDEOS POSITIVOS

FONTE: BATISTA (2008)

Por ter sido convertido para a plataforma Gateway®, a recombinação do vetor de entrada para o vetor pTcPR-GFPN deve ser realizada da mesma forma que a recombinação para o vetor pDEST™17 (item 3.11). O vetor deveria ser inserido em bactérias cálcio-competente DH5-α que eram plaqueadas em meio de cultura contendo o antibiótico ampicilina para seleção das bactérias que continham o plasmídeo.

Para verificar se as colônias continham o vetor, era realizado *toothpick* da mesma forma que o descrito no item 3.9.2, e as colônias positivas eram inoculadas em meio de cultura para fazer a extração do plasmídeo da mesma forma que o descrito no item 3.10. Quando o resultado do gel de agarose mostrava a presença dos vetores, era realizada PCR igual ao descrito no item 3.10.1 para a confirmação do inserto.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Trabalhos anteriores estudaram a comparação da variação da expressão gênica do *T. cruzi*, em nível de mRNA, entre formas replicativas e infectivas (PAVONI, 2005) e durante a metaciclogênese (PROBST, 2005). Destes genes que apresentam uma variação na expressão gênica, foram selecionados para serem amplificados, e posteriormente clonados, todos os 57 genes que codificam para proteínas hipotéticas. Destes, 27 possuem expressão diferencial nas formas de transição de epimastigota para tripomastigota metacíclico, isto é, durante a metaciclogênese, e são identificados neste trabalho pelas letras A à letra D, outros 15 possuem expressão diferencial ao se comparar epimastigota com tripomastigota metacíclico (identificados pelas letras E e F), e os outros 15 possuem expressão diferencial ao se comparar tripomastigotas metacíclicos com tripomastigotas sangüíneos (identificados pelas letras G e H).

4.1 CLONAGEM DOS GENES NO VETOR DE EXPRESSÃO

Para a clonagem dos genes, toda a sequência codificadora precisava ser amplificada por PCR. Para que várias amostras pudessem ser submetidas ao mesmo programa da reação de PCR, no mesmo termociclador, todos os genes iniciaram com programa de PCR padrão: temperatura de anelamento 55°C e tempo de extensão 3 minutos, para possibilitar que mesmo os genes com grande número de pares de bases fossem amplificados, e como pode-se observar na figura 7, os resultados foram bastante variados: alguns genes amplificaram corretamente, outros amplificaram bandas inespecíficas e outros não amplificaram. Para obtenção da PCR ótima, isto é, contendo apenas a banda com o tamanho esperado, diferentes condições de temperatura de anelamento e de tempo de extensão foram sendo testadas, sendo que, os genes que não amplificaram tiveram a temperatura de anelamento diminuída, e os genes que tiveram amplificação de fragmentos inespecíficos tiveram a temperatura de anelamento aumentada. A figura 8 mostra um exemplo de alterações nas condições da PCR até sua otimização. Após várias tentativas, 27 genes forneceram produto de PCR adequado e os outros 30 estão em processo de otimização de PCR (tabela 1).

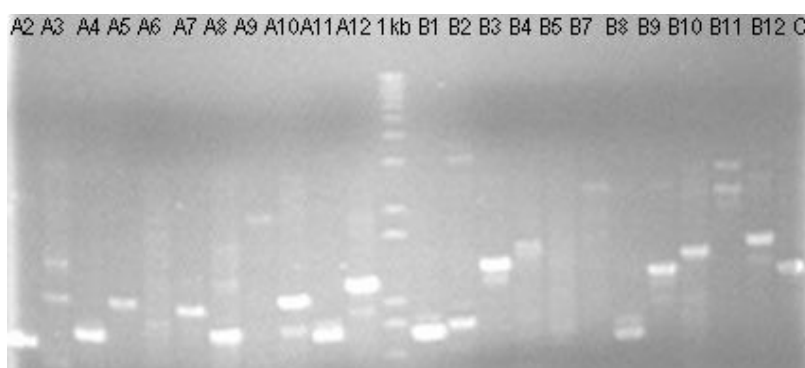


FIGURA 7 - GEL DE AGAROSE COM RESULTADO DE PCR FEITO A PARTIR DO DNA GENÔMICO. AS LETRAS SUPERIORES CORRESPONDEM À IDENTIFICAÇÃO DOS GENES, EXCETO 1 kb, QUE CORRESPONDE AO MARCADOR DE PROTEÍNAS 1 Kb plus. OS GENES A08, B07, B08, B09, B10, B11 E B12 NÃO SÃO DE PROTEÍNAS HIPOTÉTICAS E PERTENCEM A OUTRO PROJETO. DOS GENES QUE ESTÃO REPRESENTADOS NA FIGURA, OS GENES A04, A05, A11, B10 E C01 TIVERAM O RESULTADO IDEAL E JÁ ESTAVAM PRONTOS PARA SEREM CLONADOS. OS GENES A02, A03, A08, A09, A10, A12, B01, B02, B03, B04, B08, B09, B11 E B12 MOSTRARAM A AMPLIFICAÇÃO DE FRAGMENTOS INESPECÍFICOS E PRECISOU SER FEITA NOVA PCR COM TEMPERATURA DE ANELAMENTO MAIOR. OS GENES A06, B05 E B07 NÃO AMPLIFICARAM, PORTANTO PRECISOU SER FEITA NOVA PCR COM TEMPERATURA DE ANELAMENTO MENOR

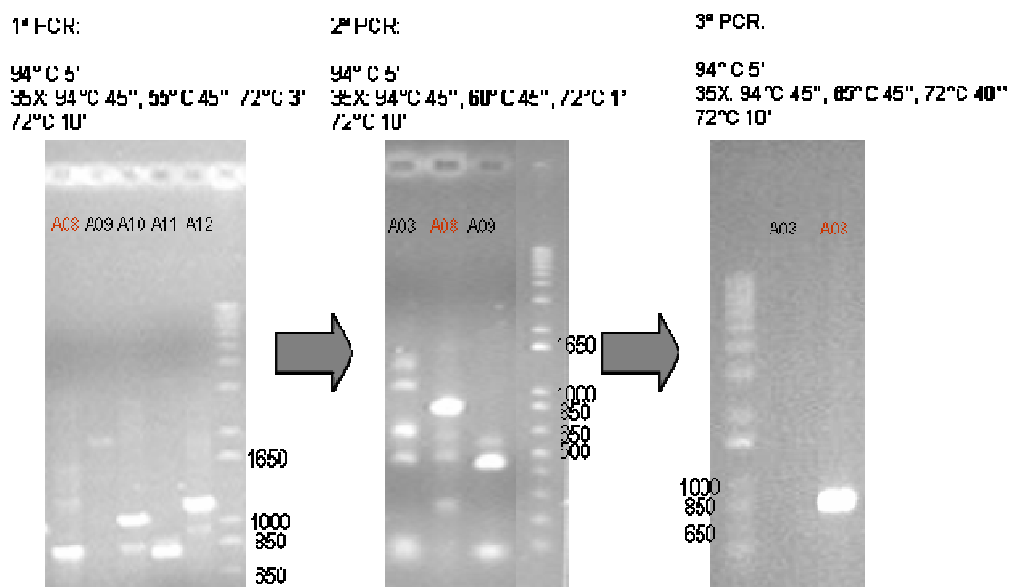


FIGURA 8 - EXEMPLO DE OTIMIZAÇÃO DE PCR DO GENE A08, DESTACADO EM VERMELHO NA FIGURA. ESTE É UM GENE QUE NÃO ESTÁ ANOTADO COMO CODIFICADOR DE PROTEÍNA HIPOTÉTICA, MAS QUE ILUSTRA BEM ESTE PROCESSO. CADA GEL É O RESULTADO DE UM PROGRAMA DIFERENTE DE PCR

TABELA 1 – GENES CODIFICADORES DE PROTEÍNAS HIPOTÉTICAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS, SELECIONADOS PARA ESTE TRABALHO

Nomenclatura do gene	ID no GeneDB ^{&}	Nomenclatura do gene	ID no GeneDB ^{&}
A02	Tc00.1047053509027.24	E04	Tc00.1047053430895.10
A03	Tc00.1047053510009.10	E05	Tc00.1047053506739.70
A04	Tc00.1047053508625.140	E06	Tc00.1047053506009.50
A05	Tc00.1047053510303.204	E09	Tc00.1047053506757.30
A06	Tc00.1047053508737.40	E11	Tc00.1047053510531.100
A07	Tc00.1047053509643.110	E12	Tc00.1047053509895.60
A09	Tc00.1047053505807.230	F04	Tc00.1047053509139.10
A10	Tc00.1047053506833.40	F06	Tc00.1047053509141.40
A11	Tc00.1047053506195.180	F07	Tc00.1047053504057.97
A12	Tc00.1047053503939.30	F08	Tc00.1047053508647.180
B01	Tc00.1047053511727.280	F09	Tc00.1047053506163.50
B02	Tc00.1047053509831.30	F10	Tc00.1047053509793.50
B03	Tc00.1047053505943.30	F11	Tc00.1047053508823.20
B04	Tc00.1047053503885.70	G01	Tc00.1047053506605.214
B05	Tc00.1047053506223.84	G02	Tc00.1047053507491.20
C01	Tc00.1047053511367.90	G03	Tc00.1047053507615.60
C04	Tc00.1047053503647.40	G05	Tc00.1047053507625.200
C06	Tc00.1047053509017.24	G06	Tc00.1047053506885.260
C07	Tc00.1047053506297.70	G08	Tc00.1047053506795.44
C08	Tc00.1047053507047.50	G10	Tc00.1047053506945.260
C09	Tc00.1047053509791.100	H01	Tc00.1047053511421.120
C10	Tc00.1047053503897.150	H02	Tc00.1047053510039.80
C11	Tc00.1047053507625.170	H04	Tc00.1047053506155.40
C12	Tc00.1047053506733.130	H07	Tc00.1047053418221.30
D05	Tc00.1047053503911.30	H08	Tc00.1047053449247.10
D06	Tc00.1047053506893.100	H09	Tc00.1047053510533.170
D12	Tc00.1047053504077.30	H11	Tc00.1047053509023.80
E02	Tc00.1047053507159.60	H12	Tc00.1047053507757.30
E03	Tc00.1047053508961.70		

NOTAS: Em negrito, genes cuja PCR para obtenção da ORF forneceu produto adequado.

& - identificação do gene no banco de dados de www.genedb.org.

Conforme ia-se obtendo resultados positivos na PCR para amplificação da ORF, os genes iam sendo clonados no vetor de entrada pENTR™/D-TOPO®. Após a clonagem do gene no plasmídeo, este era inserido em bactérias cálcio-competentes, que foram cultivadas em placas de cultura contendo o antibiótico canamicina, pois o plasmídeo possui o gene de resistência à canamicina, portanto, apenas as bactérias que possuíam o plasmídeo foram capazes de sobreviver na placa.

Para a verificação de que as colônias das bactérias possuíam o plasmídeo com o inserto correto, foi realizado PCR de colônia. Dos doze genes que foram primeiramente clonados, apenas seis mostraram resultado positivo (figura 9). Este resultado sugere que as colônias referentes aos outros seis genes não continham o plasmídeo com o gene clonado.

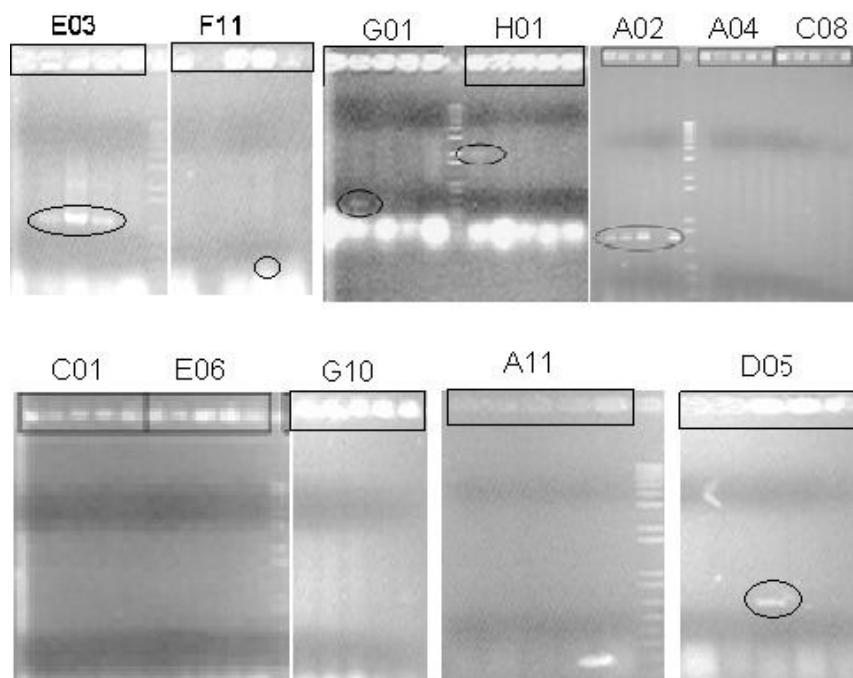


FIGURA 9 – RESULTADO DE ELETROFORESE DE PCR DE COLÔNIA. OS GENES A02, D05, E03, F11, G01 E H01 POSSUEM AO MENOS UMA COLÔNIA POSITIVA. OS DEMAIS GENES TIVERAM TODAS AS COLÔNIAS NEGATIVAS

Para certificar de que os clones negativos na PCR de colônia eram de fato negativos, foram selecionadas duas colônias de cada gene, cuja PCR de colônia não havia funcionado, (retiradas da placa referência) para fazer a extração plasmidial, pois foi questionado de que o excesso de material colocado no tubo de PCR poderia estar inibindo a reação, visto que, segundo o protocolo da plataforma Gateway®, mais de 90% das colônias deveriam ser positivas. O resultado da

extração dos plasmídeos está representado na figura 10 A, onde nota-se a presença de plasmídeo na maioria das amostras. Para verificar se estes plasmídeos possuíam o inserto, foi feita PCR com essa solução, e o resultado foi positivo para duas colônias (figura 10 B), de genes diferentes, que tinham tido resultado negativo na PCR de colônia. Portanto, concluímos que a PCR de colônia estava dando resultados falso-negativos, e passamos a utilizar a técnica de *toothpick* para a seleção de colônias positivas.

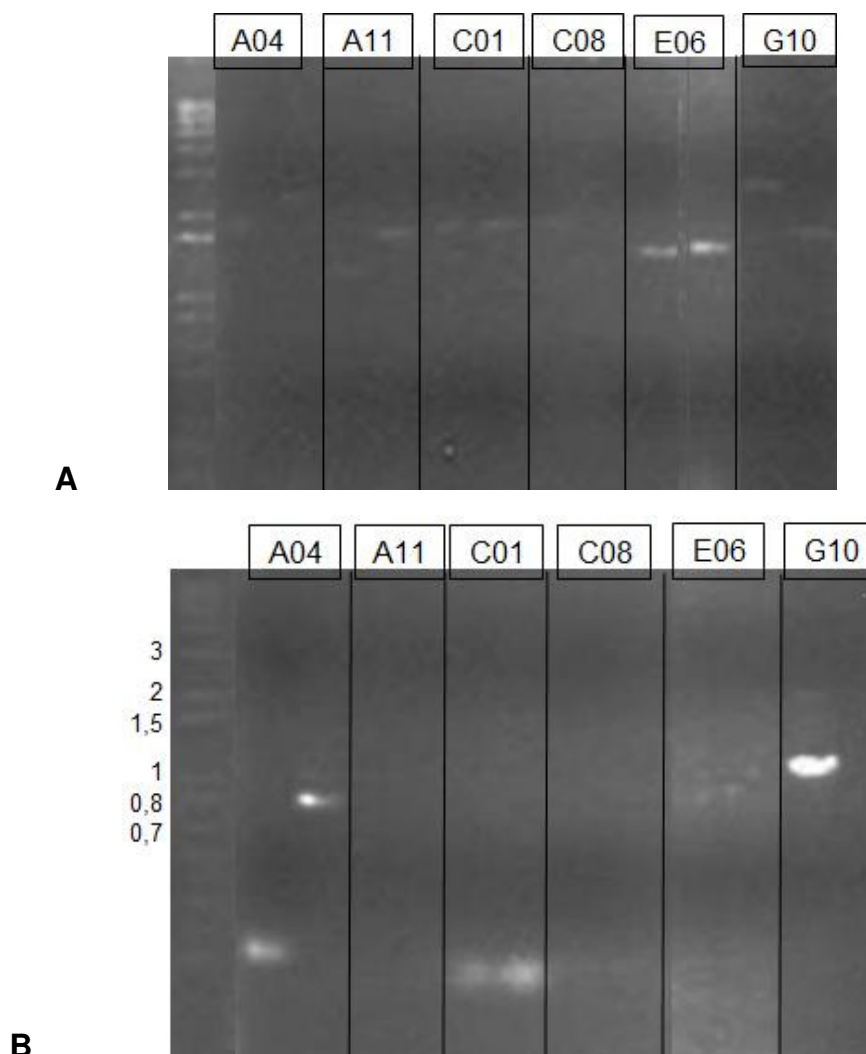


FIGURA 10 – RESULTADO DA MINIPREP (A) E DA PCR DE MINIPREP (B) PARA OS GENES QUE TIVERAM RESULTADO NEGATIVO NA PCR DE COLÔNIA. NA FIGURA B, NOTA-SE A AMPLIFICAÇÃO DE UMA COLÔNIA DO GENE A04 E UMA COLÔNIA DO GENE G10, PORTANTO, AS BACTÉRIAS FORAM TRANSFORMADAS COM O PLASMÍDEO CONTENDO O FRAGMENTO DE INTERESSE

A técnica de *toothpick* mostra a presença ou ausência de plasmídeo, mas não há como afirmar se o plasmídeo contém o inserto, por isso precisa ser comparado com um controle negativo. Para o controle negativo, deveria ser utilizado

o plasmídeo fechado e sem inserto, assim, tudo o que fosse mais pesado do que o controle negativo seria considerado como positivo. Como o plasmídeo utilizado é comprado em forma linear, não pode ser utilizado para este fim. Por isso, utilizamos a solução de miniprep do gene F11 como controle, pois este gene contém 390 pb, e é o gene com o menor número de pares de bases dentre os genes estudados. Assim, se alguma colônia em gel de agarose tivesse um plasmídeo menor que o F11, este provavelmente estaria sem o inserto, ou possuiria apenas um fragmento do inserto e seria descartada. A figura 11 mostra um exemplo de gel de agarose de *toothpick*.

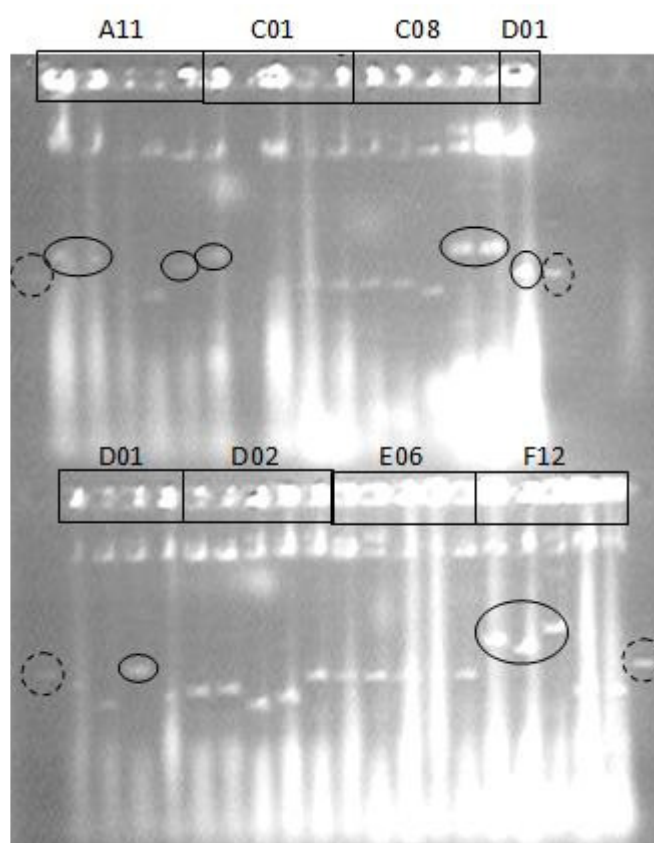


FIGURA 11 – GEL DE AGAROSE RESULTANTE DE *TOOTHPICK*. APENAS OS GENES A11, C01, C08 E E06 SÃO GENES DE PROTEÍNAS HIPOTÉTICAS E FAZEM PARTE DESTA TRABALHO. OS OUTROS GENES PERTENCEM A OUTROS PROJETOS. OS CÍRCULOS CONTÍNUOS MOSTRAM OS PROVÁVEIS PLASMÍDEOS POSITIVOS, E OS CÍRCULOS TRACEJADOS MOSTRAM O CONTROLE NEGATIVO

Após a seleção dos clones positivos, os clones foram retirados da placa referência para a extração do plasmídeo. A solução da miniprep foi aplicada em um gel de agarose para a verificação da extração do plasmídeo, e novamente foi utilizada a solução de miniprep do gene F11 para ser utilizado como controle. A

figura 11 mostra um gel de agarose com as soluções de plasmídeos purificados. Os clones utilizados para a extração dos plasmídeos foram aqueles que tiveram resultado positivo no gel de *toothpick* da figura 12.

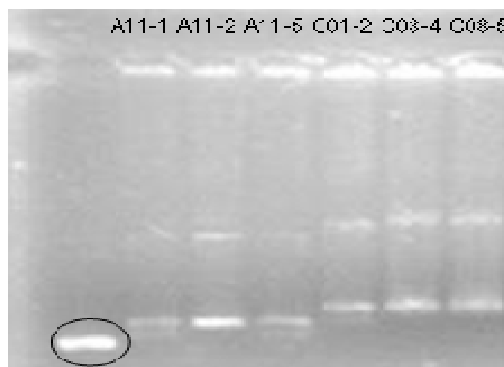


FIGURA 12 – GEL RESULTANTE DE PURIFICAÇÃO DE PLASMÍDEOS. EM DESTAQUE ESTÁ O CONTROLE

Para certificar de que o gene inserido no plasmídeo era o correto, foi feita PCR das soluções de plasmídeo purificados considerados positivos a partir do gel de agarose da miniprep, utilizando os mesmo oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação da ORF a partir do DNA genômico. O programa de PCR também foi o mesmo utilizado para a amplificação do gene a partir do DNA genômico de *T. cruzi*. A figura 13 mostra o gel de agarose com a PCR feita a partir dos clones que estão na figura 12 e, neste caso, todos os genes amplificaram.

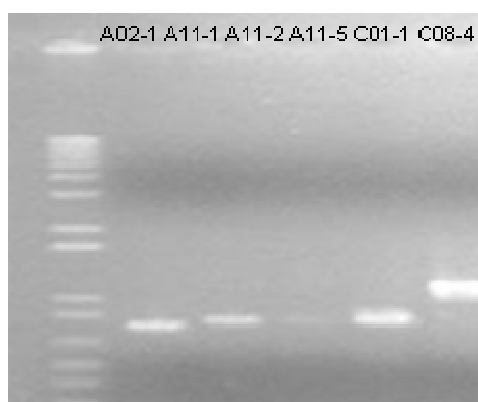


FIGURA 13 – GEL DE AGAROSE RESULTANTE DE PCR DE MINIPREP. A CANALETA DA ESQUERDA CORRESPONDE AO MARCADOR DE DNA 1 Kb plus

Após terem sido realizados estes processos com diversos genes, foi observado uma eficiência de recombinação bem mais baixa que a esperada, que seria de 90% de acordo com o descrito no manual da Invitrogen de clonagem em pENTR/Gateway®. O fato de colônias não-recombinantes estarem crescendo em placa com o antibiótico é um fato estranho. O plasmídeo confere resistência à

canamicina, portanto, colônias não-transformadas não deveriam ser aptas a crescer na placa contendo o antibiótico. E a transformação de plasmídeos sem o inserto não permitiria que a resistência fosse expressa, já que o plasmídeo é linear. Observando a figura 4.6, foi verificado que todas as colônias têm um plasmídeo. Entretanto, pelo fato de serem menores do que o controle (linha tracejada) – que contém o inserto de menor tamanho, dentre os genes estudados – eles provavelmente não contêm inserto e estes plasmídeos podem ser resultantes da recircularização do pENTR sem inserto, além da inserção de oligonucleotídeos ou de outros fragmentos presentes na reação de PCR.

Após a confirmação por PCR, o gene foi recombinado para o vetor de expressão pDESTTM17, e os plasmídeos foram inseridos em bactérias cálcio-competentes. O vetor pDESTTM17 contém a seqüência codificadora de um gene letal para a bactéria, no sítio de recombinação. Portanto, durante a recombinação, esta seqüência é trocada com a seqüência gênica de interesse que está no sítio de recombinação do vetor pENTRTM/D-TOPO. Como o processo de recombinação ocorre ao acaso, ao final da reação poderia haver plasmídeos pENTRTM/D-TOPO® com o inserto (que não recombinaram), plasmídeos pENTRTM/D-TOPO® com o gene letal (que recebeu do plasmídeo pDESTTM17 durante a recombinação), plasmídeos pDESTTM17 com o gene letal (que não recombinaram) e plasmídeos pDESTTM17 com o inserto (que recombinaram, sendo estes os plasmídeos de interesse). Para a seleção de apenas esse último tipo de plasmídeo, as células foram plaqueadas em meio de cultura contendo ampicilina, pois o plasmídeo pDESTTM17 possui o gene que confere resistência à ampicilina. Sendo assim, bactérias que foram transformadas com o plasmídeos pENTRTM/D-TOPO®, seriam eliminadas por não serem resistentes à ampicilina, e bactérias transformadas com o plasmídeo pDESTTM17 que não sofreu recombinação seriam eliminadas por possuírem o gene que codifica um produto letal para a bactéria.

Por possuir um método altamente eficiente de seleção de colônias positivas, não era necessário se realizar o *toothpick* para selecionar quais colônias eram positivas após a recombinação para o vetor pDESTTM17, então, algumas colônias de cada gene foram escolhidas, aleatoriamente, e inoculadas em meio de cultura para realizar a extração do plasmídeo. Após a obtenção dos plasmídeos purificados, foi realizado eletroforese para verificar o processo de extração, e então feito PCR dessa solução para confirmação de que o inserto estava correto. Para uma maior garantia

de que o gene clonado era o gene de interesse, foi realizado o seqüenciamento dos insertos.

Dos vinte e sete genes que amplificaram o DNA genômico, vinte genes já foram inseridos com sucesso no vetor de expressão, e os outros sete estão em processos de clonagem, como pode ser observado na tabela 2.

TABELA 2 – GENES CLONADOS NO VETOR DE EXPRESSÃO E O RESPECTIVO TAMANHO DA PROTEÍNA CODIFICADA (EM kDa).

Gene	Tamanho (kDa)	Gene	Tamanho (kDa)
A02	29,3	E03	41,9
A04	30,7	E05	83,9
A11	29,3	F11	13,3
B01	27,9	G01	20,6
B02	19,6	G05	39,6
C01	40,6	G10	40,0
C08	46,8	H01	82,0
C11	73,6	H07	46,5
C12	77,4	H09	54,5
D05	26,3	H11	42,5

NOTA: Em negrito, os genes cuja expressão foi testada em *E. coli*.

4.2 SEQÜENCIAMENTO

Todos os genes que estavam inseridos no vetor pDEST™17 foram seqüenciados, porém apenas oito genes foram seqüenciados completamente, pois os resultados dos seqüenciamentos destes genes nas duas direções se sobrepuseram. Para se obter a seqüência completa dos demais genes, precisa ser feito novos oligonucleotídeos que se anelem em partes intermediárias dos genes, pois, por possuírem um grande número de pares de bases, os oligonucleotídeos que se anelam apenas nas extremidades do gene não são capazes de promover a seqüência do gene completo.

Em uma análise preliminar deste seqüenciamento, foi observado que apenas dois genes não foram clonados corretamente: os genes G01 e G05. O gene G01 foi amplificado de forma correta, mas ele foi inserido de forma invertida no vetor de entrada, isto é, a extremidade 5'-CACC-3' do *primer-F* que deveria ter se pareado com a seqüência 3' GTGG 5' do plasmídeo pENTR™/D-TOPO®, foi inserida na outra extremidade do vetor. A análise utilizando *BLAST* para o gene G05 alinhou a

nossa seqüência com fragmentos de outras três proteínas hipotéticas do *T. cruzi*, provavelmente resultado de um anelamento inespecífico dos oligonucleotídeos iniciadores durante a PCR para a obtenção da ORF a partir do DNA genômico, e este problema não pôde ser detectado antes porque o tamanho deste fragmento amplificado era similar ao tamanho do gene esperado.

4.3 EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Dos vinte genes que estão clonados no vetor de expressão, onze foram escolhidos aleatoriamente para testar a capacidade de expressar a proteína recombinante (tabela 4.2). Estes genes foram selecionados antes de se ter obtido o resultado o seqüenciamento, e por isso os genes G01 e G05 foram selecionados, e o resultado negativo foi posteriormente explicado pelo resultado do seqüenciamento, como descrito no item 4.2. O teste de expressão foi feito em 2 ml de meio de cultura, e o protocolo de expressão foi o mesmo para todos os genes. Para a eletroforese, foi feito um gel de poliacrilamida 10% para as proteínas maiores (E03, E05, G05 e H01, com 41,9, 83,9, 39,6 e 82 kDa, respectivamente) e um gel de poliacrilamida 13% para as outras proteínas (A02, A04, A11, B01, B02, F11 e G01, com 29,3; 30,7; 29,6; 27,9; 19,6; 13,3 e 20,6 kDa, respectivamente). Como pode ser observado na figura 14, apenas os genes E03, A11 e B01 tiveram clara expressão. Para confirmar quais proteínas foram expressas, foi feito *western-blot* com revelação realizada com o anticorpo anti-histidina e o resultado está na figura 4.15.

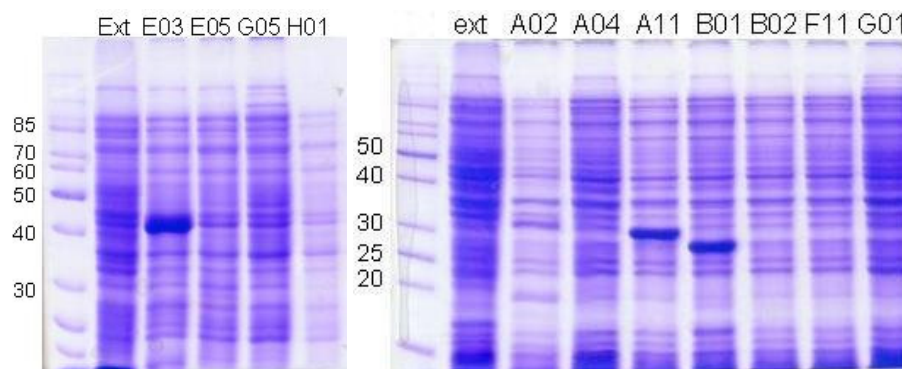


FIGURA 14 - GEL RESULTANTE DA ELETROFORESE SDS-PAGE DO TESTE DE EXPRESSÃO. OS VALORES AO LADO ESQUERDO DA FIGURA REFEREM-SE AO TAMANHO DAS PROTEÍNAS DO MARCADOR, EM kDa. **EXT**: EXTRATO DE PROTEÍNAS DA *E. coli* BL21(DE3)pLysS

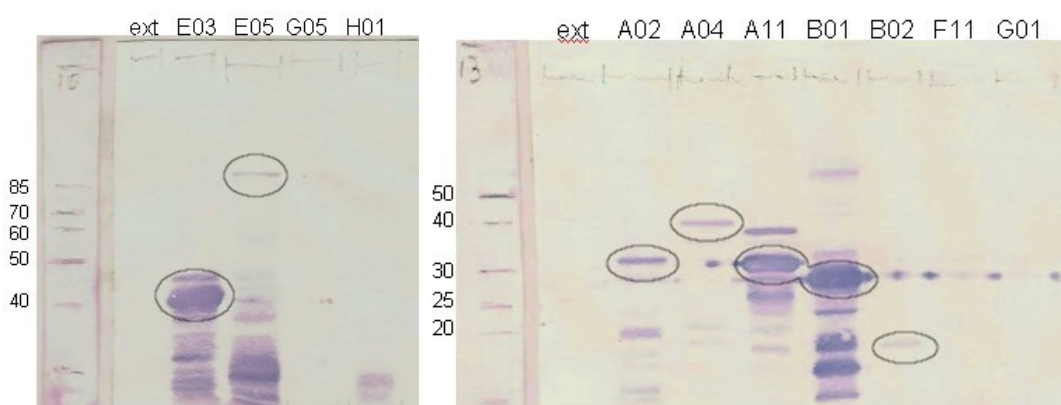


FIGURA 15 – *WESTERN-BLOT* COM ANTI-HISTIDINA DO TESTE DE EXPRESSÃO. NA FIGURA ESTÃO MARCADAS AS POSSÍVEIS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

O resultado do *western-blot* corrobora com o observado no gel de poliacrilamida, para as proteínas A11, B01 e E03, que tiveram alta expressão. Este resultado também mostrou que as proteínas A02, A04, B02 e E05 expressaram em baixa quantidade e as proteínas F11, G01, G05 e H01 não expressaram.

Aqueles genes que não foram expressos no teste de expressão (F11, G01, G05 e H01) tiveram seus estudos interrompidos. Os outros genes continuaram com as próximas etapas para expressão da proteína, e os resultados estão descritos abaixo:

4.3.1 Proteínas A02 (29,3 kDa), A04 (30,7 kDa), B02 (19,6 kDa) e E05 (83,9 kDa)

A baixa quantidade expressa destas proteínas, no teste de expressão, já alertava para uma dificuldade ao se tentar fazer a expressão em larga escala. E os resultados obtidos para todas estas proteínas foram ou a não expressão, ou expressão em quantidade insuficiente para purificação. A figura 16 mostra os resultados das tentativas de algumas destas expressões. Sendo assim, os estudos para estas proteínas foram interrompidos.

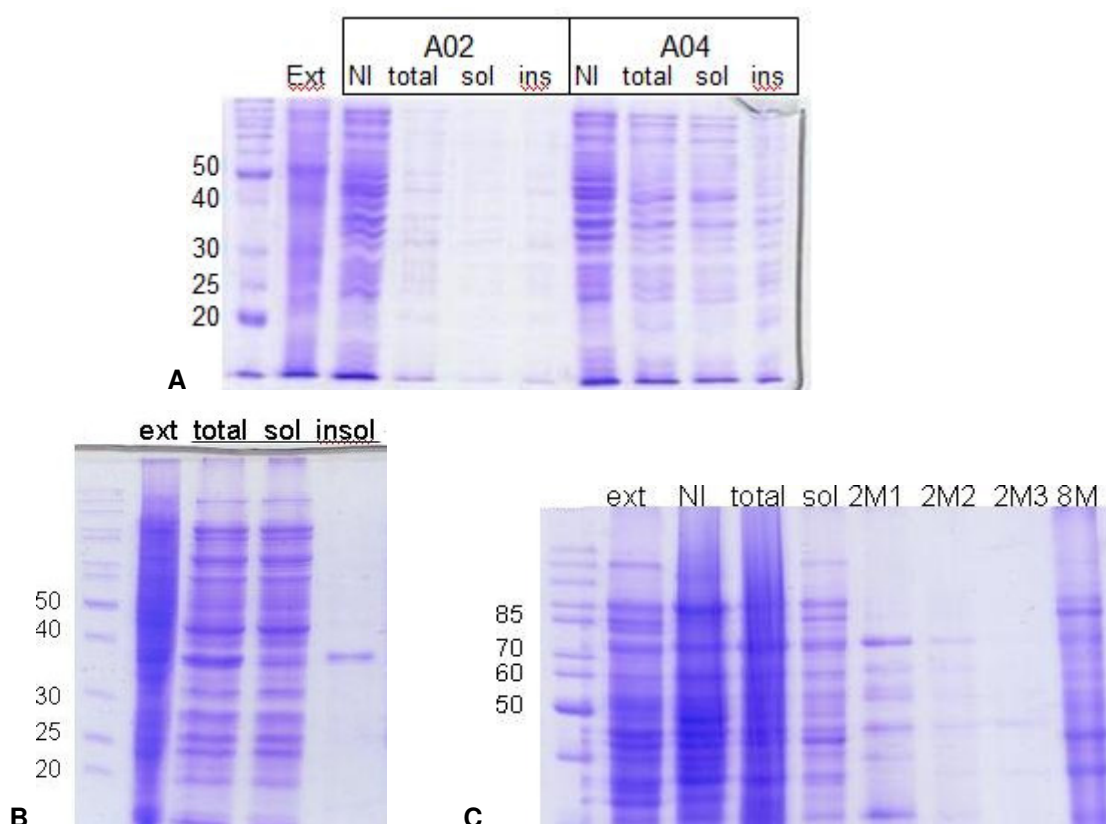


FIGURA 16 – EXPRESSÕES EM LARGA ESCALA. A: A02 E A04; B: B02; C: E05. **EXT.:** EXTRATO DE PROTEÍNAS DA BACTÉRIA *E. coli* BL21; **NI:** FRAÇÃO NÃO INDUZIDA, QUANDO AS BACTÉRIAS FORAM CULTIVADAS EM MEIO DE CULTURA SEM IPTG; **TOTAL:** FRAÇÃO TOTAL, QUE CONTÉM TODAS AS PROTEÍNAS DAS BACTÉRIAS ONDE A EXPRESSÃO FOI INDUZIDA; **SOL.:** FRAÇÃO SOLÚVEL, QUE CONTÉM APENAS AS PROTEÍNAS SOLÚVEIS DAS BACTÉRIAS ONDE A EXPRESSÃO FOI INDUZIDA; **INS.** OU **INSOL.** OU **8M:** FRAÇÃO INSOLÚVEL, QUE CONTÉM APENAS AS PROTEÍNAS INSOLÚVEIS DAS BACTÉRIAS ONDE A EXPRESSÃO FOI INDUZIDA; **2M1, 2M2 E 2M3:** FRAÇÕES CORRESPONDENTES ÀS PRIMEIRA, SEGUNDA E TERCEIRA LAVAGEM COM URÉIA 2M

4.3.2 Proteína A11 (29,6 kDa)

O protocolo para a expressão das proteínas A11 e E03 (item 4.3.4) difere do descrito no item 3.14.2 porque estas foram as primeiras proteínas trabalhadas, e o protocolo de expressão utilizado até o momento não fazia o uso das lavagens com tampão com uréia, e as proteínas foram ressuspendidas diretamente em tampão de amostra 4X. Após a expressão, a proteína foi purificada a partir do gel preparativo e foi obtido aproximadamente 2 ml de solução contendo a proteína, na concentração 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. A figura 17 mostra o resultado de SDS-*page* com a proteína purificada. Foram escolhidos dois camundongos que tiveram resultado negativo no teste pré-imune para serem feitas as inoculações.

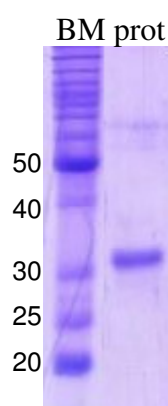


FIGURA 17 – SDS-PAGE DA PROTEÍNA A11 PURIFICADA. **BM**: MARCADOR DE PESO MOLECULAR *BENCHMARK™*; **prot**: PROTEÍNA A11 PURIFICADA

Sete dias após a quarta injeção, foi realizado o teste para verificar se foram feitos anticorpos contra as proteínas recombinantes e o resultado obtido está mostrado na figura 18 A. Como este resultado foi obtido depois de 7 dias após a quarta inoculação (pico de produção de anticorpos), uma quinta inoculação foi realizada. O *western-blot* para detecção da proteína recombinante foi repetido para a confirmação da presença dos anticorpos, e como pode-se observar na figura 18 B, houve o aparecimento de uma banda de aproximadamente 60 kDa além da banda específica de aproximadamente 30 kDa. Porém, como a banda específica continuou presente, os camundongos foram sacrificados para obtenção do soro sanguíneo. Foi obtido aproximadamente 300 μl de soro de cada camundongo.

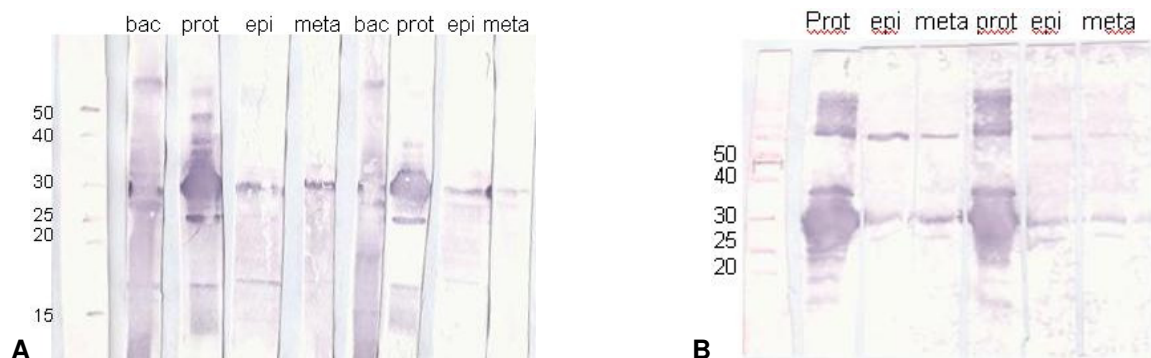


FIGURA 18 – RESULTADO DO *WESTERN-BLOT* DO EXTRATO DE PROTEÍNAS CONTRA OS SOROS DOS CAMUNDONGOS, APÓS 4ª (A) E 5ª (B) INJEÇÕES. **BAC.**: EXTRATO DA BACTÉRIA; **PROT.**: PROTEÍNA RECOMBINANTE PURIFICADA; **EPI.**: EXTRATO DE *T. cruzi* DA FORMA EPIMASTIGOTA; **META.**: EXTRATO DE *T. cruzi* DA FORMA TRIPOMASTIGOTA METACÍCLICO

O soro dos camundongos foi utilizado em imunofluorescências, utilizando os parasitas em forma epimastigota e em forma tripomastigota metacíclico e, como pode-se observar na figura 19, os anticorpos reconheceram proteínas presentes por toda a célula, resultado que não era inesperado, pois proteínas difusas por toda a célula são comuns. Para uma maior confiabilidade dos dados, este procedimento precisaria ser repetido. Infelizmente, os anticorpos foram perdidos durante a purificação (vide abaixo).

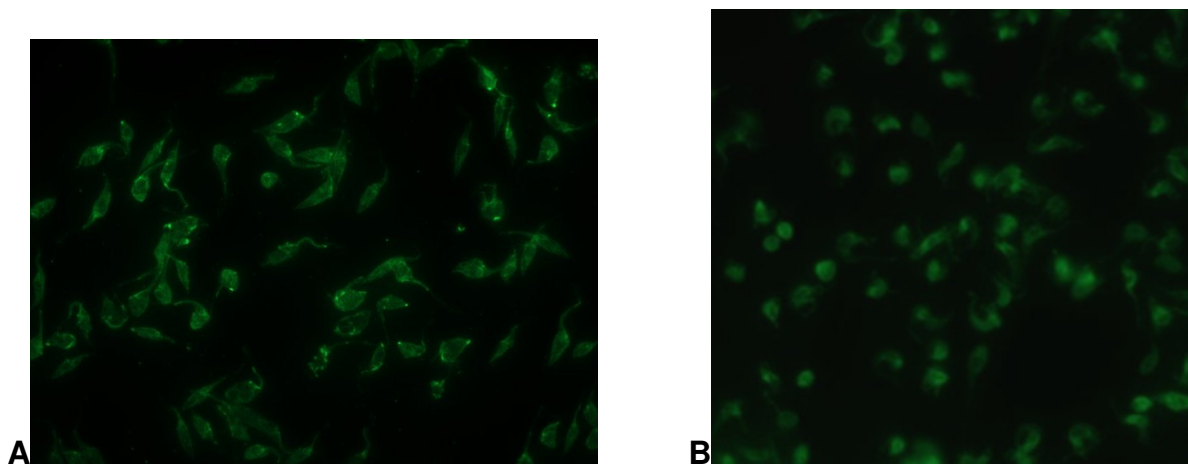


FIGURA 19 – RESULTADO DAS IMUNOFLUORESCÊNCIAS UTILIZANDO O SORO DOS CAMUNDONGOS EM FORMAS EPIMASTIGOTAS (A) E TRIPOMASTIGOTAS METACÍCLICAS (B)

O soro dos camundongos também foi utilizado para a detecção da proteína nos extratos das diferentes fases do ciclo de vida do *T. cruzi*, e o resultado está representado na figura 20, onde não é possível perceber uma variação significativa da expressão da proteína nos diferentes extratos. Nesta figura, observa-se ainda a presença da banda de aproximadamente 60 kDa em todos os extratos, como já

mentionado anteriormente. Para eliminar estes anticorpos que estão reconhecendo a banda maior, foi realizado a purificação dos anticorpos, e o soro contendo os anticorpos purificados foi utilizado para detecção da proteína nos extratos de *T. cruzi*. Conforme pode-se observar na figura 21, não houve o aparecimento de bandas, levando a crer que os anticorpos específicos contra a proteína recombinante foram perdidos. Sendo assim, foram realizadas novas inoculações em outros dois camundongos para obtenção de novo soro.

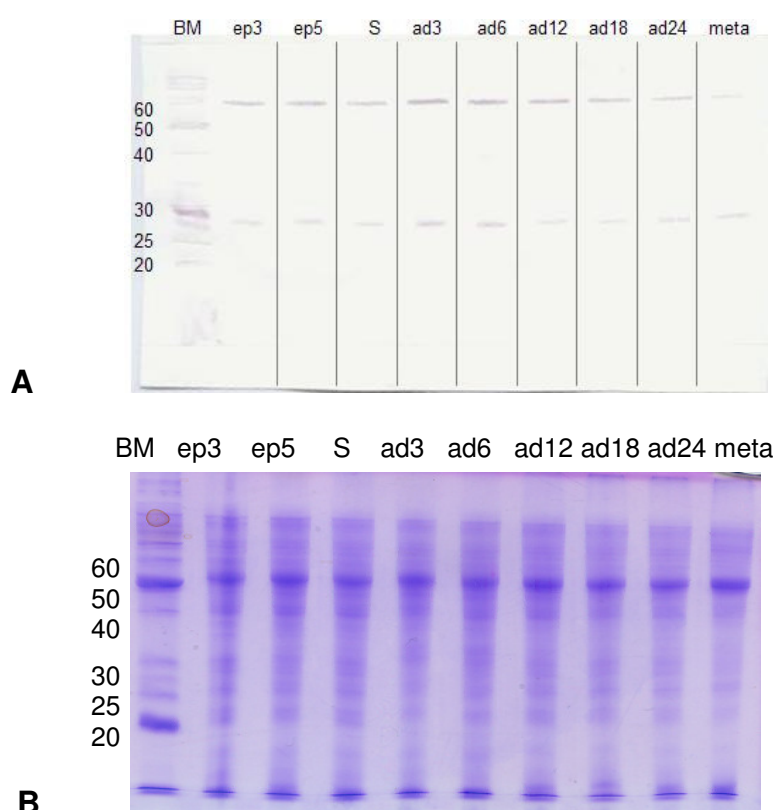


FIGURA 20 - EXPRESSÃO DA PROTEÍNA A11 EM DIFERENTES AMOSTRAS DA METACICLOGÊNESE (A) E RESULTADO DE ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (B), FEITO PARA MOSTRAR QUE A QUANTIA DE PROTEÍNA É A MESMA PARA TODAS AS CANALETAS. OS VALORES AO LADO ESQUERDO DA FIGURA CORRESPONDEM AO TAMANHO DA PROTEÍNA (EM kDa). **BM**: MARCADOR DE PESO MOLECULAR *BENCHMARK*TM; **EP3**: EXTRATO DE *T. cruzi* EM FORMA EPIMASTIGOTA EM TRÊS DIAS DE CULTURA; **EP5**: EXTRATO DE *T. cruzi* EM FORMA EPIMASTIGOTA EM CINCO DIAS DE CULTURA; **S**: EXTRATO DE *T. cruzi* APÓS DUAS HORAS DE ESTRESSE NUTRICIONAL; **AD3, AD6, AD12, AD18, AD24**: EXTRATO DE *T. cruzi* ADERIDOS POR 3, 6, 12, 18 E 24 HORAS, RESPECTIVAMENTE; **META**: EXTRATO DE *T. cruzi* EM FORMA TRIPOMASTIGOTA METACÍCLICA

Prot PR epi stress

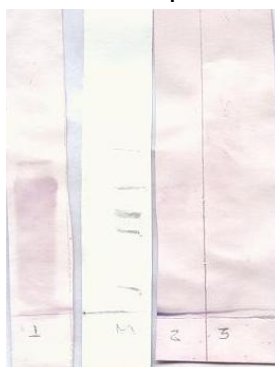


FIGURA 21 – RESULTADO DE *WESTERN-BLOT* E DETECÇÃO DA PROTEÍNA UTILIZANDO O SORO COM ANTICORPOS PURIFICADOS EM AMOSTRA DA PROTEÍNA RECOMBINANTE (**PROT**) E EM AMOSTRAS DE EXTRATOS PROTÉICOS DE *T. cruzi* EM FORMA EPIMASTIGOTA COM CINCO DIAS DE CULTURA (**EPI**) E EM DUAS HORAS APÓS ESTRESSE NUTRICIONAL (**STRESS**). PR: MARCADOR DE PESO MOLECULAR *PAGERULER™*

O resultado do *western-blot* para a detecção da proteína utilizando os novos soros dos camundongos mostrou novamente o aparecimento de bandas além da banda com o tamanho da proteína nativa. Este resultado está representado na figura 22, sendo que as duas primeiras canaletas foram feitas com o soro de um camundongo e as outras duas com o soro de outro camundongo.

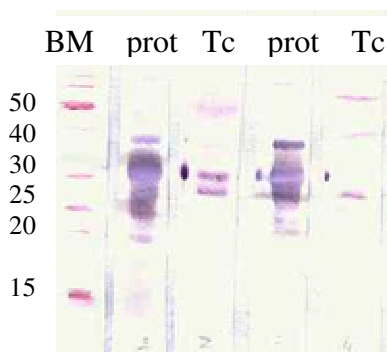


FIGURA 22 – RESULTADO DO *WESTERN-BLOT* UTILIZANDO O SORO COM ANTICORPOS EM AMOSTRA DA PROTEÍNA RECOMBINANTE (**PROT**) E EM AMOSTRA DE EXTRATO PROTÉICO DE *T. cruzi* EM FORMA EPIMASTIGOTA COM CINCO DIAS DE CULTURA (**Tc**). **BM**: MARCADOR DE PESO MOLECULAR *BENCHMARK™*. OS VALORES AO LADO ESQUERDO DA FIGURA INDICAM O TAMANHO DA PROTEÍNA, EM kDa

Os camundongos foram sacrificados e foi obtido aproximadamente 500 µl de soro de cada um dos camundongos. Como houve o aparecimento de bandas além do tamanho da proteína, pode-se concluir que os anticorpos dos camundongos estão reconhecendo outras proteínas, além da proteína de interesse. Portanto, o soro do primeiro camundongo, que está representado na figura 22, foi purificado para obtenção apenas dos anticorpos desejados. Foi realizado novo *western-blot*

para a detecção da proteína no extrato de *T. cruzi*, utilizando o soro purificado, e o resultado está representado na figura 23. Como pode-se observar na figura, ainda há o aparecimento de mais de uma banda. Porém, como a purificação foi feita utilizando a proteína purificada, este resultado pode ser devido a uma ligação inespecífica entre o anticorpo produzido e outra proteína do *T. cruzi* ou pode ser que a proteína de interesse esteja presente no extrato de *T. cruzi* com diferentes tamanhos, talvez resultado de uma degradação.

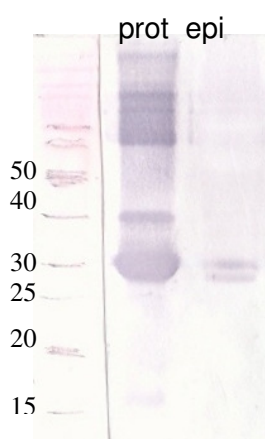


FIGURA 23 – RESULTADO DO *WESTERN-BLOT* E DETECÇÃO DA PROTEÍNA UTILIZANDO O SORO PURIFICADO. **epi**: EXTRATO PROTÉICO DE *T. cruzi* EM FORMA EPIMASTIGOTA COM CINCO DIAS DE CULTURA; **prot**: PROTEÍNA PURIFICADA

O soro purificado foi utilizado em *western-blot* competitivo, e o resultado está representado na figura 24. O resultado da figura 24 A foi revelado por 10 minutos e nota-se a marcação de diversas proteínas do extrato, provavelmente resultado de ligações inespecíficas. Pelo fato de que a revelação do *western-blot* sem a proteína purificada adicionada ao soro do camundongo ocorreu por 2 minutos, este procedimento foi repetido com revelação também por 2 minutos, e o resultado está representado na figura 24 B.

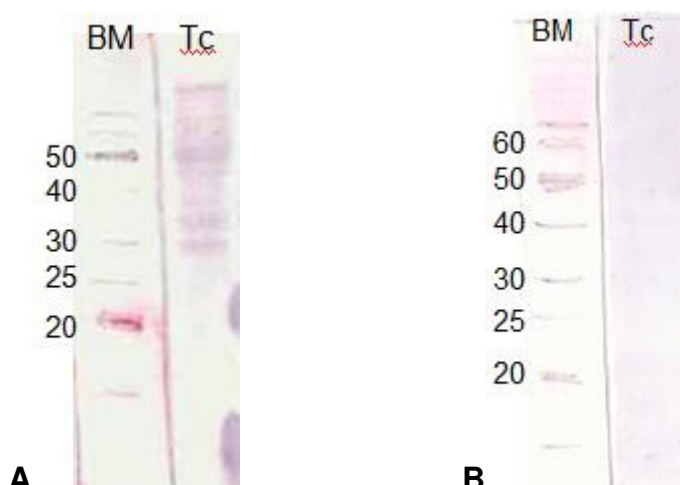
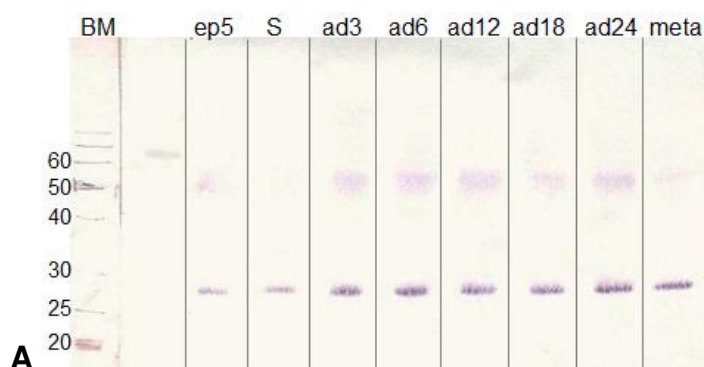


FIGURA 24 – RESULTADO DO *WESTERN-BLOT* COMPETITIVO E DETECÇÃO DA PROTEÍNA UTILIZANDO O SORO PURIFICADO, COM REVELAÇÃO POR 10 (A) E POR 2 (B) MINUTOS. **BM**: MARCADOR DE PESO MOLECULAR *BENCHMARK™* **Tc**: EXTRATO PROTÉICO DE *T. cruzi* EM FORMA EPIMASTIGOTA COM CINCO DIAS DE CULTURA. OS VALORES AO LADO ESQUERDO DA FIGURA CORRESPONDEM AO TAMANHO DA PROTEÍNA

O resultado mostrado no *western-blot* competitivo indica que os anticorpos presentes no soro ligaram-se preferencialmente à proteína recombinante adicionada ao soro do camundongo, em vez de ligarem-se à proteína presente no extrato do *T. cruzi*, pelo fato de a proteína purificada estar presente em grande quantidade. Isto mostrou a especificidade dos anticorpos à proteína recombinante, que foi inoculada nos camundongos e, portanto, estes anticorpos puderam ser utilizados para os estudos seguintes.

O soro purificado foi utilizado para verificar a variação da expressão da proteína em diferentes momentos da metaciclogênese. Como pode-se observar na figura 25, a proteína tem um leve aumento na expressão durante a metaciclogênese, fato que corrobora com os resultados obtidos por microarranjo mostrados na figura 26, e também com o resultado anterior, utilizando o outro soro do camundongo, antes da purificação (figura 20).



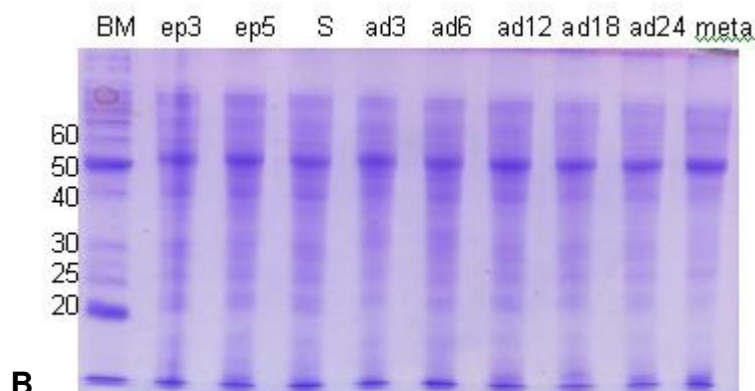


FIGURA 25 - EXPRESSÃO DA PROTEÍNA A11 EM DIFERENTES AMOSTRAS DA METACICLOGÊNESE (A) E RESULTADO DE ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (B), FEITO PARA MOSTRAR QUE A QUANTIA DE PROTEÍNA É A MESMA PARA TODAS AS CANALETAS. OS VALORES AO LADO ESQUERDO DA FIGURA CORRESPONDEM AO TAMANHO DA PROTEÍNA (EM kDa). **BM**: MARCADOR DE PESO MOLECULAR *BENCHMARK™*; **EP3**: EXTRATO DE *T. cruzi* EM FORMA EPIMASTIGOTA EM TRÊS DIAS DE CULTURA; **EP5**: EXTRATO DE *T. cruzi* EM FORMA EPIMASTIGOTA EM CINCO DIAS DE CULTURA; **S**: EXTRATO DE *T. cruzi* APÓS DUAS HORAS DE ESTRESSE NUTRICIONAL; **AD3, AD6, AD12, AD18, AD24**: EXTRATO DE *T. cruzi* ADERIDOS POR 3, 6, 12, 18 E 24 HORAS, RESPECTIVAMENTE; **META**: EXTRATO DE *T. cruzi* EM FORMA TRIPOMASTIGOTA METACÍCLICA

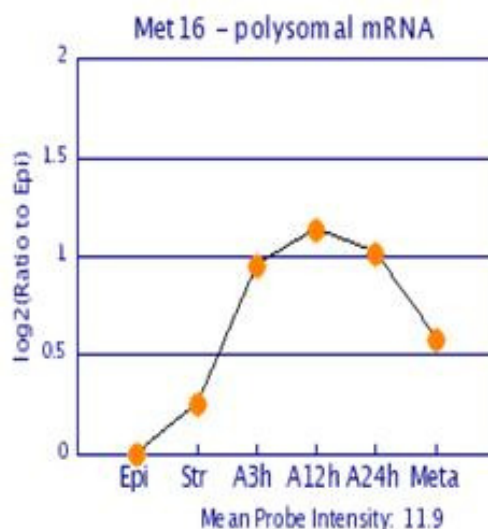


FIGURA 26 – RESULTADO DE MICROARRANJO QUE MOSTRA A EXPRESSÃO, EM NÍVEL DE mRNA, DURANTE DIFERENTES MOMENTOS DA METACICLOGÊNESE, COM UM PICO DA EXPRESSÃO APROXIMADAMENTE NA METADE DA METACICLOGÊNESE

FONTE: PROBST (2005)

O soro purificado foi também utilizado em imunofluorescência, com diluição 1:50, mas não houve o aparecimento de marcação. Nova imunofluorescência será realizada utilizando o soro diluído 1:10 e 1:25.

4.3.3 Proteína B01 (27,9 kDa)

Apesar de que no teste de expressão foi detectada a expressão da proteína B01 em grande quantidade, quando foi realizada a expressão em larga escala, seguindo o protocolo básico descrito no 3.14.2, houve pouca expressão, como pode ser observado na figura 27 A. A seta está apontando para a provável banda correspondente à proteína recombinante. Como tentativa de aumentar o nível de expressão, foi repetida a indução com temperatura de 30°C, pois em uma temperatura mais baixa, as proteínas são expressas mais lentamente, e assim há maior chance da proteína ser enovelada em sua forma correta, pois se trata de uma proteína que não é própria da bactéria. Porém, o resultado obtido ainda não foi satisfatório, como observado na figura 27 B, onde, novamente há uma seta indicando a provável banda correspondente à proteína recombinante.

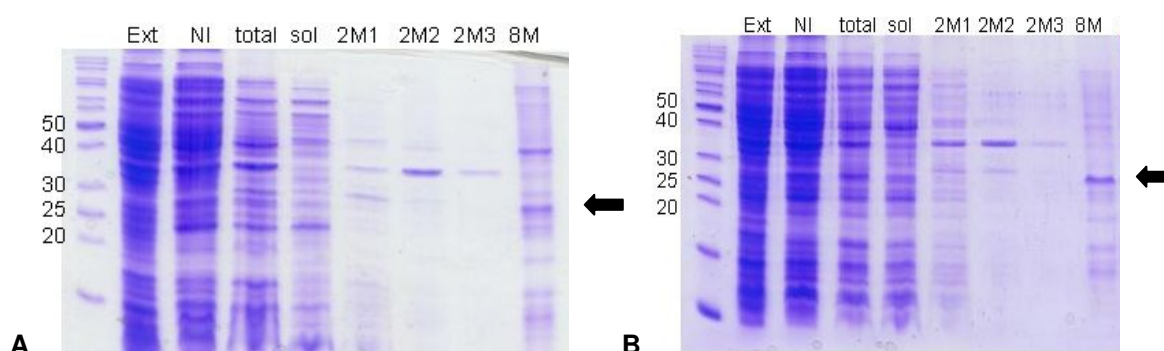


FIGURA 27 – EXPRESSÃO EM LARGA ESCALA DA PROTEÍNA B01, COM TEMPERATURAS DE INDUÇÃO 37°C (A) E 30°C (B). **EXT.**: EXTRATO DA BACTÉRIA; **NI**: CONTROLE NÃO-INDUZIDO; **total**: FRAÇÃO TOTAL DAS PROTEÍNAS; **sol**: FRAÇÃO DAS PROTEÍNAS SOLÚVEIS; **2M1**: PRIMEIRA LAVAGEM COM TAMPÃO URÉIA 2M; **2M2**: SEGUNDA LAVAGEM; **2M3**: TERCEIRA LAVAGEM; **8M**: RESSUSPENDIDO EM TAMPÃO URÉIA 8M

Para a visualização mais clara sobre a quantia de proteína expressa, foi realizado *western-blot* e detecção da proteína recombinante com anticorpo anti-histidina (com as amostras da expressão a 30°C), como descrito no item 3.16, e o resultado está representado na figura 28. O resultado mostrou que a proteína está sendo expressa, mesmo em ausência do indutor (IPTG) e, a adição de IPTG induziu a expressão de outra proteína de menor tamanho (ou fragmento de proteína), de aproximadamente 15 kDa.

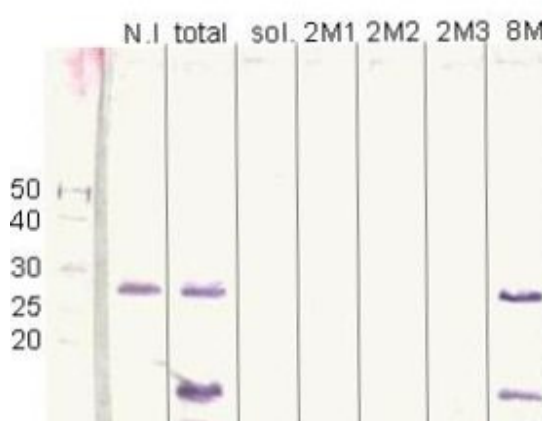


FIGURA 28 - *WESTERN-BLOT* DA PROTEÍNA B01 COM ANTI-HISTIDINA. **EXT.:** EXTRATO DA BACTÉRIA; **NI:** CONTROLE NÃO-INDUZIDO; **TOTAL:** FRAÇÃO TOTAL DAS PROTEÍNAS; **SOL.:** FRAÇÃO DAS PROTEÍNAS SOLÚVEIS; **2M1:** PRIMEIRA LAVAGEM COM TAMPÃO URÉIA 2M; **2M2:** SEGUNDA PASSAGEM; **2M3:** TERCEIRA PASSAGEM; **8M:** RESSUSPENDIDO EM TAMPÃO URÉIA 8M

A amostra da fração insolúvel da expressão realizada a 30°C foi utilizada para a purificação da proteína a partir do gel preparativo. Foi obtido 3 ml de solução com a proteína em concentração 100 ng/μl e foi feita eletroforese em gel de poliacrilamida (*SDS-page*), o resultado está representado na figura 29. Como pode-se observar nesta figura, a quantia de proteína purificada foi muito baixa, sendo insuficiente para ser utilizada nas inoculações em camundongos. Portanto, seus estudos seguintes foram interrompidos.

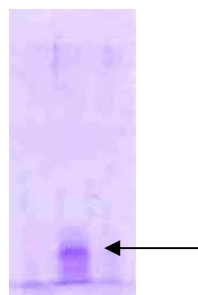


FIGURA 29 – RESULTADO DE *SDS-PAGE* COM A SOLUÇÃO DA PROTEÍNA B01 PURIFICADA. A SETA ESTÁ APONTANDO PARA A BANDA QUE CORRESPONDE À PROTEÍNA

4.3.4 Proteína E03 (41,9 kDa)

Assim como a proteína A11, a proteína E03 foi expressa em larga escala e purificada a partir do gel preparativo, que resultou em aproximadamente 3 ml de solução contendo 0,1 µg/µl de proteína. A figura 30 mostra o resultado de SDS-page com 3 µg da proteína purificada.

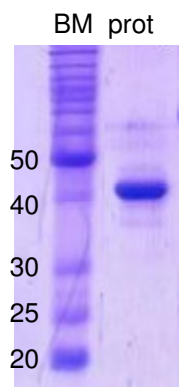


FIGURA 30 – SDS-PAGE DA PROTEÍNA E03 PURIFICADA. **BM**: MARCADOR DE PESO MOLECULAR *BENCHMARK™*; **PROT**: PROTEÍNA E03 PURIFICADA

Foram feitas as quatro inoculações em dois camundongos e foi feito *western-blot* do extrato de proteínas do *T. cruzi* contra o soro dos camundongos e o resultado está na figura 31, sendo que as três primeiras canaletas referem-se a um camundongo, e as outras três referem-se ao outro camundongo. Neste resultado, observa-se o aparecimento de uma banda dupla no extrato de proteínas de *T. cruzi* em forma epimastigota, que poderia ser resultado de uma degradação no extrato protéico, ou de diferentes isoformas da proteína. Como este foi o único momento onde este resultado foi observado, a conclusão mais plausível é de que o extrato estava degradado. Para confirmar, este procedimento será repetido com outras amostras de extrato protéico. Apesar dessa banda dupla, o resultado foi considerado positivo, pois aparentemente houve produção de anticorpos contra a proteína recombinante e, portanto, os camundongos foram sacrificados assim que este resultado foi obtido e os soros foram obtidos para realização de imunoenaios. Foram obtidos aproximadamente 500 µl de soro de cada camundongo.

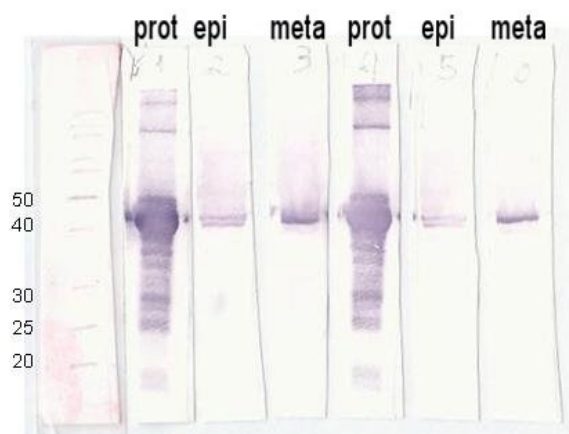


FIGURA 31 – *WESTERN-BLOT* DO EXTRATO DE PROTEÍNAS CONTRA O SORO DOS CAMUNDONGOS. **prot**: PROTEÍNA RECOMBINANTE PURIFICADA; **epi**: EXTRATO DE *T. cruzi* EM FORMA EPIMASTIGOTA; **meta**: EXTRATO DE *T. cruzi* EM FORMA TRIPOMASTIGOTA METACÍCLICA

Os soros dos camundongos foram utilizados em *western-blot* competitivo, e o resultado está mostrado na figura 32. O resultado da figura 32 A foi revelado por 10 minutos e nota-se a marcação de diversas proteínas do extrato, provavelmente resultado de ligações inespecíficas. Pelo fato de que a revelação do *western-blot* sem a proteína purificada adicionada ao soro do camundongo ocorreu por 4 minutos e meio, este procedimento foi repetido com revelação também por 4 minutos e meio, e o resultado está representado na figura 32 B.

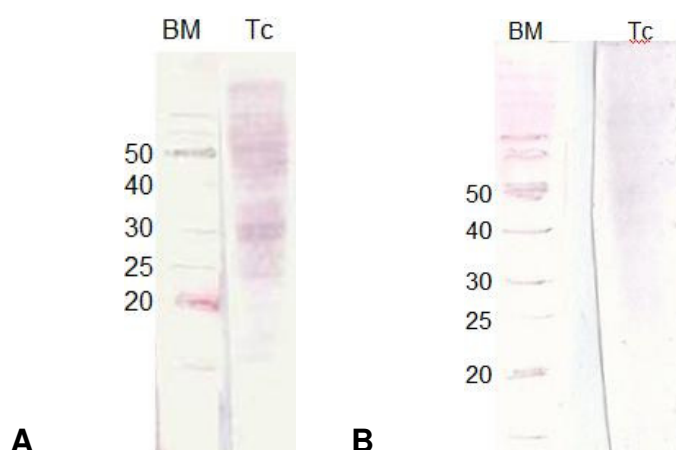
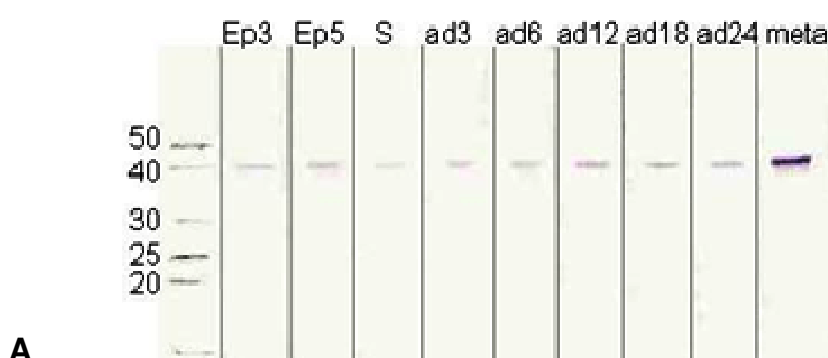


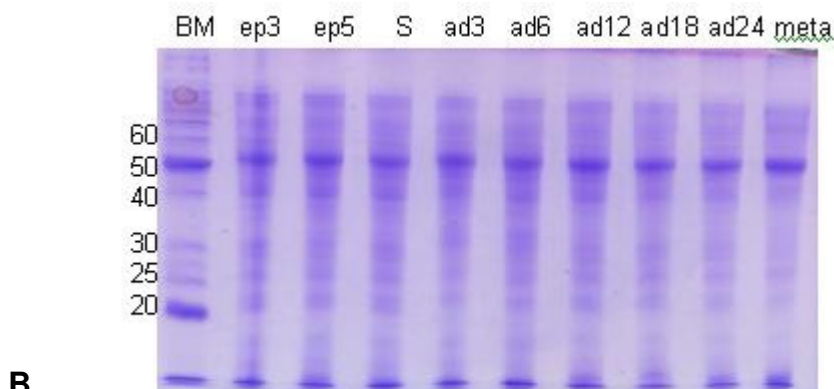
FIGURA 32 – RESULTADO DO *WESTERN-BLOT* COMPETITIVO E DETECÇÃO DA PROTEÍNA UTILIZANDO O SORO PURIFICADO, COM REVELAÇÃO POR 10 (A) E 4 MINUTOS E MEIO (B). **BM**: MARCADOR DE PESO MOLECULAR *BENCHMARK™* **Tc**: EXTRATO PROTÉICO DE *T. cruzi* EM FORMA EPIMASTIGOTA COM CINCO DIAS DE CULTURA. OS VALORES AO LADO ESQUERDO DA FIGURA CORRESPONDEM AO TAMANHO DA PROTEÍNA EM kDa

O resultado mostrado no *western-blot* competitivo indica que os anticorpos presentes no soro ligaram-se preferencialmente à proteína recombinante adicionada ao soro do camundongo, em vez de ligarem-se à proteína presente no extrato do *T. cruzi*, pelo fato de a proteína purificada estar presente em grande quantidade. Isto mostrou a especificidade dos anticorpos à proteína recombinante, que foi inoculada nos camundongos e, portanto, estes anticorpos puderam ser utilizados para os estudos seguintes.

Os soros dos camundongos foram então utilizados para verificar a variação da expressão da proteína em diferentes momentos da metaciclogênese. Como pode-se observar na figura 33, a proteína está claramente aumentada na fase de tripomastigota metacíclica, fato que corrobora com os resultados obtidos por microarranjo (PAVONI, 2005), mostrado na figura 34.

Para verificar a localização da proteína nos parasitas, os soros dos camundongos foram utilizados em imunofluorescências, e o resultado está na figura 35, onde pode-se observar uma maior concentração da proteína (em verde), entre o cinetoplasto e a base do flagelo da forma epimastigota (figura 35 A), e também próximo ao cinetoplasto na forma amastigota (figura 35 B). Na forma tripomastigota metacíclica, forma onde há maior expressão desta proteína, não houve marcação. Para confirmação destes resultados, este procedimento deverá ser repetido.





B

FIGURA 33 – EXPRESSÃO DA PROTEÍNA E03 EM DIFERENTES AMOSTRAS DA METACICLOGÊNESE (A) E RESULTADO DE ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (B), FEITO PARA MOSTRAR QUE A QUANTIA DE PROTEÍNA É A MESMA PARA TODAS AS CANALETAS. OS VALORES AO LADO ESQUERDO DA FIGURA CORRESPONDEM AO TAMANHO DA PROTEÍNA (EM kDa). **BM**: MARCADOR DE PESO MOLECULAR *BENCHMARK*TM; **EP3**: EXTRATO DE *T. cruzi* EM FORMA EPIMASTIGOTA EM TRÊS DIAS DE CULTURA; **EP5**: EXTRATO DE *T. cruzi* EM FORMA EPIMASTIGOTA EM CINCO DIAS DE CULTURA; **S**: EXTRATO DE *T. cruzi* APÓS DUAS HORAS DE ESTRESSE NUTRICIONAL; **AD3, AD6, AD12, AD18, AD24**: EXTRATO DE *T. cruzi* ADERIDOS POR 3, 6, 12, 18 E 24 HORAS, RESPECTIVAMENTE; **META**: EXTRATO DE *T. cruzi* EM FORMA TRIPOMASTIGOTA METACÍCLICA

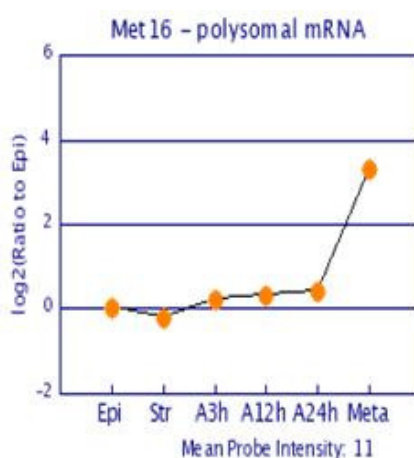


FIGURA 34 – RESULTADO DE MICROARRANJO QUE MOSTRA A EXPRESSÃO, EM NÍVEL DE mRNA, DURANTE DIFERENTES MOMENTOS DA METACICLOGÊNESE, COM UM PICO DA EXPRESSÃO EM TRIPOMASTIGOTA METACÍCLICO

FONTE: PAVONI (2005)

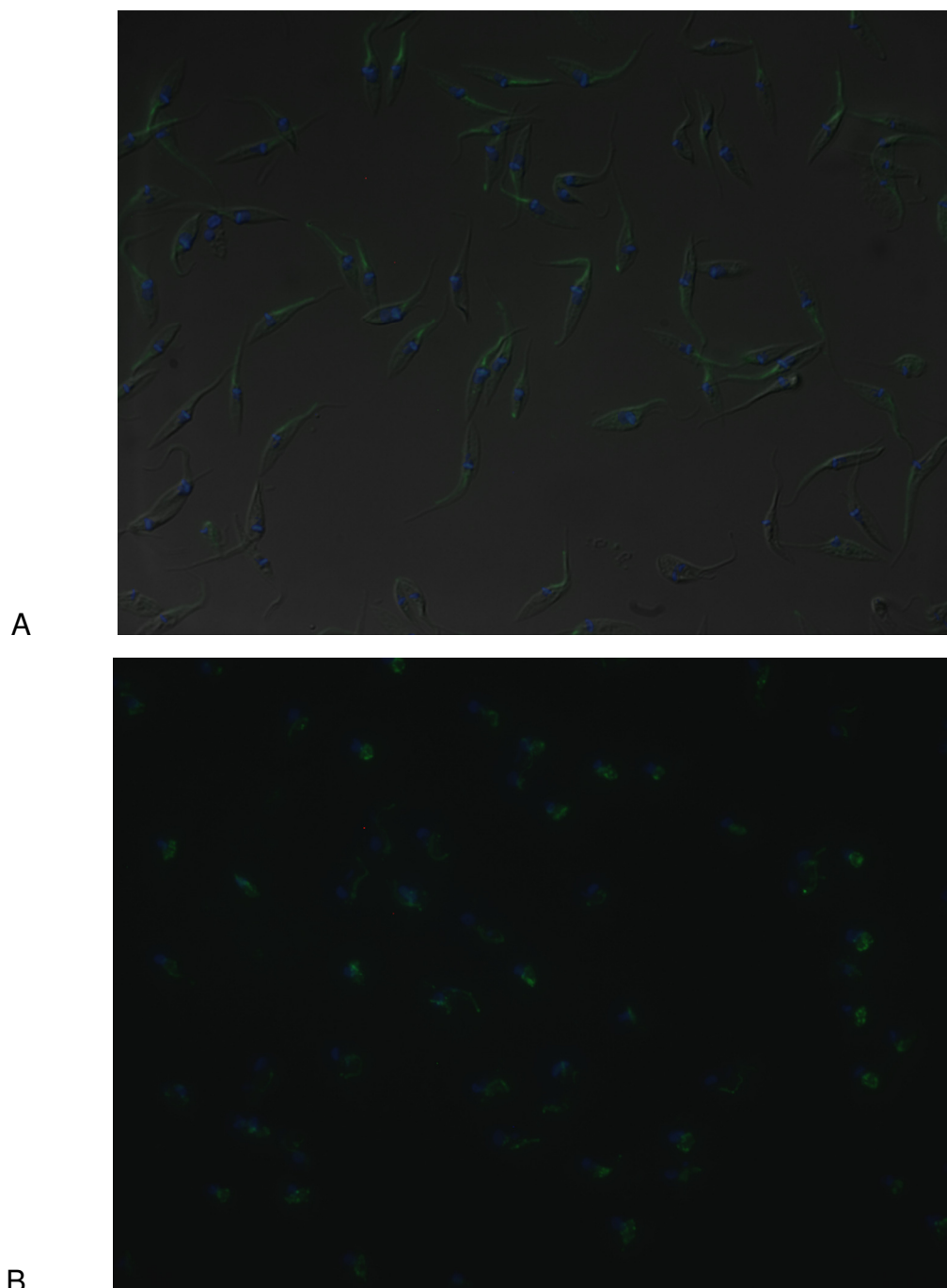


FIGURA 35 – RESULTADO DAS IMUNOFLUORESCÊNCIAS UTILIZANDO O SORO DOS CAMUNDONGOS EM FORMAS EPIMASTIGOTAS (A) E TRIPOMASTIGOTAS DE CULTURA CELULAR E AMASTIGOTAS (B)

Este soro também foi utilizado para imunolocalização em microscopia eletrônica de transmissão, trabalho realizado por colaboração do Dr. Maurilio Soares. O resultado da imunolocalização em forma epimastigota, representado na figura 36, mostra que a proteína está difusa ao redor do núcleo e próximo da base do flagelo (mostrado pelas setas azuis). Para resultados mais conclusivos, este

procedimento deve ser repetido, visando a observação de outras regiões da célula, assim como com outras formas evolutivas.

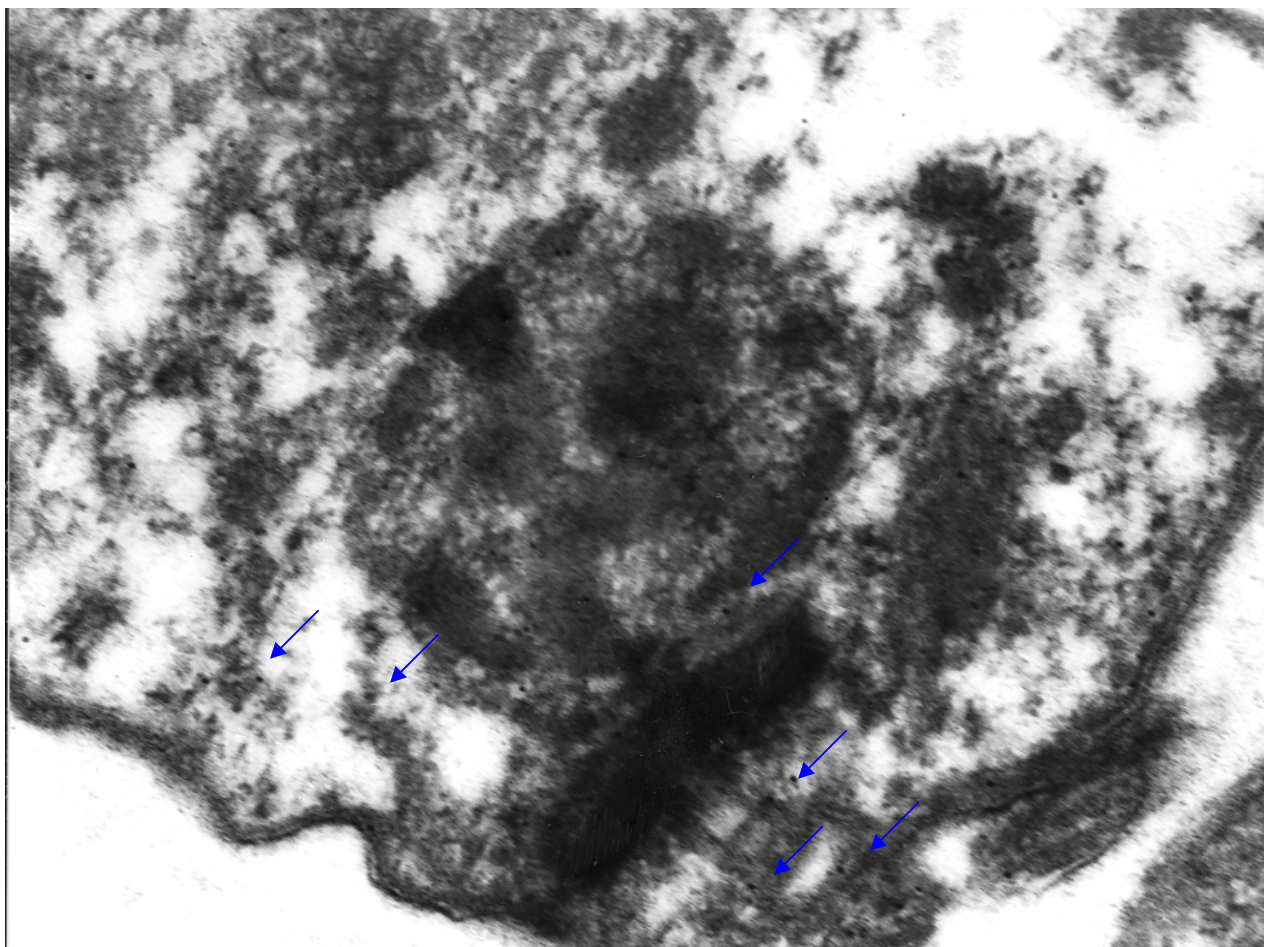


FIGURA 36 – RESULTADO DE IMUNOLocalização POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO. AS SETAS AZUIS MOSTRAM ALGUNS PONTOS ONDE A PROTEÍNA SE ENCONTRA (BASE DO FLAGELO E PRÓXIMO DO NÚCLEO)

O gene para a proteína E03 foi clonado no vetor de expressão em *T. cruzi* pTcPR-GFPN e o vetor foi inserido em bactérias *E. coli* DH5- α cálcio-competentes que foram plaqueadas em meio de cultura com antibiótico ampicilina. Algumas colônias foram selecionadas aleatoriamente para a realização de *toothpick*, e o resultado está mostrado na figura 37, onde nota-se que os clones 1, 2, 3, 4, 5 possuem um plasmídeo do mesmo tamanho, o clone 6 possui um plasmídeo menor e o clone 7 tem dois plasmídeos, um com o mesmo tamanho que o plasmídeo dos clones 1 a 5 e outro com um plasmídeo com o mesmo tamanho que o plasmídeo do clone 6, fato que já havia sido observado em outros estudos pelo nosso grupo, mas que ainda não se sabe a explicação.

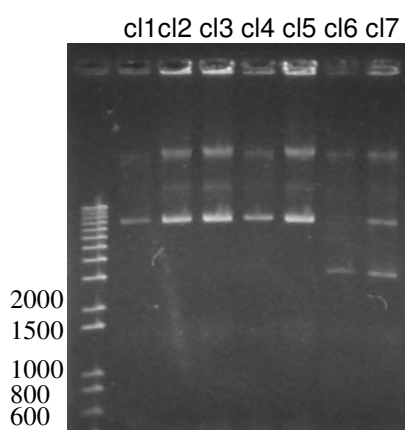


FIGURA 37 – RESULTADO DO *TOOTHPICK* APRESENTADO EM GEL DE AGAROSE. OS VALORES AO LADO ESQUERDO DA FIGURA CORRESPONDEM AO TAMANHO DOS FRAGMENTOS (EM PARES DE BASES). **CL1 A CL7:** DIFERENTES CLONES SELECIONADOS

Os clones 2, 3 e 5 foram selecionados para extração do plasmídeo utilizando o *kit* comercial *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen), e o resultado está apresentado na figura 38 A, onde pode-se notar que a purificação do plasmídeo foi eficiente para os três clones. Para a verificação da presença do inserto, foi realizada PCR da solução com os plasmídeos e o resultado foi positivo para todos os clones, como pode-se observar na figura 38 B, portanto, qualquer um dos clones poderá ser utilizado para a transfecção para expressão da proteína em *T. cruzi*.

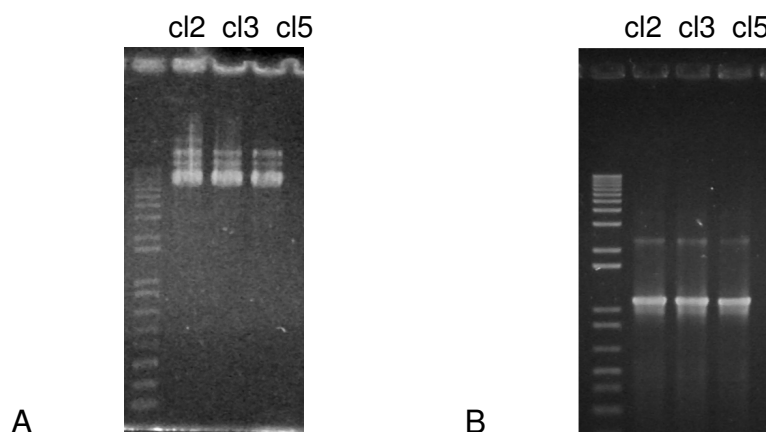


FIGURA 38 – **A:** RESULTADO DA MINI-PREPARAÇÃO DE PLASMÍDEOS APRESENTADO EM GEL DE AGAROSE. **B:** RESULTADO DA PCR FEITA A PARTIR DA SOLUÇÃO DE PLASMÍDEO APRESENTADO EM GEL DE AGAROSE. **CL2, CL3 E CL5:** DIFERENTES CLONES UTILIZADOS

Por não haver tempo hábil para os estudos com esta proteína utilizando este vetor, esta solução foi armazenada para ser utilizada em estudos futuros.

5 CONCLUSÕES

Este trabalho, baseado em metodologias em larga escala, possibilitou que os estudos para a caracterização pudessem ser realizados com um subgrupo de proteínas, visto que as condições para amplificação, clonagem e expressão são extremamente variáveis para os diferentes genes e, portanto, estes procedimentos não puderam ser efetuados com sucesso para todos os genes, como já discutido anteriormente. Sendo assim, este trabalho deveria seguir apenas com os genes que obtiveram sucesso, sem demandar esforços excessivos para a caracterização de todos os genes.

Um trabalho em larga escala exige metodologias adequadas e, por isso foi escolhida a plataforma Gateway®, que não obteve o sucesso esperado (eficiência de recombinação acima de 90%). Como iniciamos com um número grande de proteínas, essa baixa eficiência não foi prejudicial ao trabalho, que continuou apenas com os genes que foram inseridos com sucesso no vetor de expressão.

Apenas uma parte dos genes que estava no vetor de expressão foi escolhida para testar a capacidade de expressão, quando inseridos em uma cepa adequada de bactéria. Dos onze genes escolhidos, quatro não expressaram e outros quatro expressaram em pequena quantidade. A ausência da expressão não pode ser considerada como resultado negativo, pois diferentes proteínas necessitam de diferentes condições de indução para serem expressas. Portanto, é possível que estas proteínas fossem expressas, caso a indução pra expressão fosse realizada com outras condições. No entanto, o interesse maior era prosseguir os estudos com aquelas proteína que expressaram já na primeira tentativa. Após a expressão de duas proteínas e inoculações em camundongos para produção de anticorpos, estes anticorpos foram utilizados em imunoenaios.

Utilizando os anticorpos específicos, foi observada expressão da proteína aqui denominada como A11 no extrato do parasita, a partir da técnica de *western-blot*. O resultado negativo na imunofluorescência não pode ser conclusivo enquanto este procedimento não for repetido.

Esta proteína possui ortólogos em *Leishmania major* e em *Trypanosoma brucei*, além do domínio DUF292 (Proteína Eucariótica de Função Desconhecida),

fatos que evidenciam que este gene codifique, de fato, uma proteína, e não se trata apenas de erro de anotação ou de uma seqüência nucleotídica não codificada.

Também foi observada a expressão da proteína aqui denominada como E03 no extrato do parasita, utilizando a técnica de *western-blot* realizado com os anticorpos produzidos pelos camundongos especificamente contra esta proteína. O aumento da expressão desta proteína na forma de tripomastigota metacíclica, fato já observado para o mRNA deste gene, indica que seja uma proteína importante para o parasita nesta fase de vida. A localização desta proteína no tripomastigota metacíclico pode ajudar a inferir alguma função, mas infelizmente, a imunofluorescência mostrou resultado negativo. Estes procedimentos serão repetidos para certificação destes resultados.

Diferentemente da proteína A11, a proteína E03 não possui nenhum domínio identificado e ortólogo apenas em *L. major*. Apesar disto, os resultados obtidos neste trabalho mostram claramente a expressão desta proteína no parasita, podendo ser classificada como uma proteína de função desconhecida.

Sendo assim, o presente trabalho se mostrou eficiente para a caracterização de duas proteínas do *T. cruzi*, anotadas no banco de dados como hipotéticas.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, Z. A.; ANDRADE S. G.; OLIVEIRA, G. B.; ALONSO, D. R. Histopathology of the conducting tissue of the heart in Chagas' myocarditis. **Amer Heart J** v. 95, p. 316-324, 1978.
- AKOPYANTS, N. S.; MATLIB, R. S.; BUKANOVA, E. M. et al. Expression profiling using random genomic DNA microarrays identifies differentially expressed genes associated with three major developmental stages of the protozoan parasite *Leishmania major*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 136, n. 1, p. 71-86, 2004.
- ALMEIDA, R.; GILMARTIN, B. J.; McCANN, S. H. et al. Expression profiling of the *Leishmania* life cycle: cDNA arrays identify developmentally regulated genes present but not annotated in the genome. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 136, n. 1, p. 71-86, 2004.
- ÁVILA A. R., DALLAGIOVANNA B., YAMADA-OGATTA S. F., MONTEIRO-GÓES V., FRAGOSO S. P., KRIEGER M. A., GOLDENBERG S. Stage-specific gene expression during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **Genetics and Molecular Research**, v. 2, n. 1, p. 159-68, 2003
- BAPTISTA, C. S.; VENCIO, R. Z.; ABDALA, S. et al. DNA microarrays for comparative genomics and analysis of gene expression in *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 138, n. 2, p. 183-94, 2004.
- BAPTISTA, C. S.; VÊNCIO, R. Z.; ABDALA, S. et al. Differential transcription profiles in *Trypanosoma cruzi* associated with clinical forms of Chagas disease: Maxicircle NADH dehydrogenase subunit 7 gene truncation in asymptomatic patient isolates. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 150, n. 2, p. 236-48, 2006.
- BATISTA, M. **Construção de Vetores para Caracterização de Genes de *Trypanosoma cruzi* em um Sistema para Clonagem em Alta Demanda**. 124 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.
- BONALDO, M. C.; SOUTO-PADRON, T.; SOUZA, W. de; GOLDENBERG, S. Cell-substrate adhesion during *Trypanosoma cruzi* differentiation. **Journal of Cell Biology**, v. 106, p. 1349-1358, 1988.
- BREMS, S.; GUILBRIDE, D. L.; GUNDLESODJIR-PLANCK, D. et al. The transcriptomes of *Trypanosoma brucei* Lister 427 and TREU927 bloodstream and procyclic trypomastigotes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 139, p. 163-72, 2005.
- BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Ann Rev of Microbiology**, v. 27, p. 347-82, 1973.

CAMARGO, E. P. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 6, p. 93-100, 1964.

CANÇADO, J. R. In: BRENNER, Z.; ANDRADE, A. Z. e BARRAL-NETTO, M. (eds) ***Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas***. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2000.

CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 1, p. 159-218, 1909.

CONTRERAS, V. T.; SALLES, J. M.; THOMAS, N.; MOREL, C. M.; GOLDENBERG, S. *In vitro* differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 16, p. 315-327, 1985.

CONTRERAS, V. T.; ARAUJO-JORGE, T. C.; BONALDO, M. C.; THOMAS, N.; BARBOSA, H. S.; MEIRELLES, M. N. L.; GOLDENBERG, S. Biological aspects of the DM 28C clone of *Trypanosoma cruzi* after metacyclogenesis in chemically defined media. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 83, p. 123-133, 1988.

COURA, J. R.; JUNQUEIRA, A. C.; BOIA, M. N.; FERNANDES, O.; BONFANTE, C.; CAMPOS, J. E.; SANTOS, L.; DEVERA, R. Chagas disease in the Brazilian Amazon: IV. a new cross-sectional study. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 44, p. 159-65, 2002.

DIAS J. C. P. In: BRENNER, Z.; ANDRADE, A. Z. e BARRAL-NETTO, M. (eds) ***Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas***. 2. ed. Guanabara Koogan S.A. (2000).

DIEHL, S.; DIEHL, F.; EL-SAYED, N. M. et al. Analysis of stage-specific gene expression in the bloodstream and the procyclic form of *Trypanosoma brucei* using a genomic DNA microarray. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 123, n. 2, p. 115-23, 2002.

EL-SAYED, N. M.; MYLER, P. J.; BARTHILOMEU, D. C. et al. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi* etiologic agent of Chagas disease. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 409-15, 2005a.

EL-SAYED, N. M.; MYLER, P. J.; BLANDIN, G. et al. Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 404-09, 2005b.

FRAGOSO, S. P., GOLDENBERG, S. Cloning and characterization of the gene encoding *Trypanosoma cruzi* topoisomerase II. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 55, p. 127-34, 1992.

GARCIA, E. S.; AZAMBUJA, P. Fisiologia de triatomíneos: desenvolvimento, reprodução e interação com *T. cruzi*. In: BRENNER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL NETTO, M. (eds), ***Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas***, 2a Ed., Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, p. 41-7, 2000.

GeneDB. Disponível em: <<http://www.genedb.org/>>. Acesso em 10/03/2007.

GOLDENBERG, S.; SALLES, J. M.; CONTRERAS, V. T.; LIMA FRANCO, M. P.; KATZIN, A. M.; COLLI, W. e MOREL, C. M. Characterization of messenger RNA from epimastigotes and metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **FEBS Lett**, v. 180, p. 265-270, 1985.

GUIMOND, C. ; TRUDEL, N. ; BROCHU, C. et al. Modulation of gene expression in *Leishmania* drug resistant mutants as determined by targeted DNA microarrays. **Nucleic Acids Res**, v. 31, n. 20, p. 5886-5896, 2003.

HOLZER, T. R.; McMASTER, W. R.; FORNEY, J. D. Expression profiling by whole-genome interspecies microarray hybridization reveals differential gene expression in procyclic promastigotes, lesion-derived amastigotes, and axenic amastigotes in *Leishmania mexicana*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 146, n. 2, p. 198-218, 2006.

INVITROGEN. Disponível em: <<http://www.invitrogen.com>>. Acesso em 15/03/2008.

KOUMANDOU, V. L.; NATESAN, S. K.; SERGEENKO, T.; FIELD, M.C. The trypanosome transcriptome is remodelled during differentiation but displays limited responsiveness within life stages. **BMC Genomics**, v. 9, n. 298, 2008.

LABORATORY IDENTIFICATION OF PARASITES OS PUBLIC HEALTH CONCERNS. Disponível em <<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>>. Acesso em 15/04/2008.

LEIFSO, K.; COHEN-FREUE, G.; DOGRA, N. et al. Genomic and proteomic expression analysis of *Leishmania* promastigote and amastigote life stages: the *Leishmania* genome is constitutively expressed. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 152, n. 1, p. 35-46, 2007.

McNICOLL, F.; DRUMMELSMITH, J.; MULLER, M. et al. A combined proteomic and transcriptomic approach to the study of stage differentiation in *Leishmania infantum*. **Proteomics**, v. 6, n. 12, p. 3567-81, 2006.

MINNING, T. A.; BUA, J.; GARCIA, G. A. et al. Microarray profiling of gene expression during trypomastigote to amastigote transition in *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 131, p. 55-64, 2003.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Programa Especial para Pesquisa e Treinamento em Doenças Tropicais (TDR). Disponível em: <<http://www.who.int/tdr/diseases/chagas>>. Acesso em: 10/04/2008.

PAVONI, D. P. **Caracterização Genômica Funcional das Formas Infectivas de *Trypanosoma cruzi***. 110 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Instituto Oswaldo Cruz, Curitiba, 2005.

PCR – Amplificação de DNA in vitro. Disponível em: <<http://www.e-escola.pt/site/topico.asp?topico=339>>. Acesso em 20/04/2008.

PROBST, C. M. **Descrição da Metaciclogênese de *Trypanosoma cruzi* pelo uso de microarranjos de DNA**. 100 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Instituto Oswaldo Cruz, Curitiba, 2005.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular cloning : A laboratory manual . **Cold Spring Harbor**, New York, 1989.

SAXENA, A.; WORTHEY, E. A.; YAN, S. et al. Evaluation of differential gene expression in *Leishmania major* Friedlin procyclics and metacyclics using DNA microarray analysis. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 129, p. 103-14, 2003.

SAXENA, A.; LAHAV, T.; HOLLAND, N. et al. Analysis of the *Leishmania donovani* transcriptome reveals an ordered progression of transient and permanent changes in gene expression during differentiation. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 152, n.1, p. 53-65, 2007.

SCHMUNIS, G A. A tripanossomíase americana e seu impacto na Saúde Pública das Américas. In BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A; BARRAL NETTO, M. (eds), ***Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas***. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., p. 1-15, 2000.

SHERLOCK, I. A. Vetores. In BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL NETTO, M. (eds), ***Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas***, 2a Ed., Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, p. 21-47, 2000.

SOUZA, W. Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. **International Review of Cytology**, v. 86, p. 197-283, 1984.

SRIVIDYA, G.; DUNCAN, R.; SHARMA, P. et al. Transcriptome analysis during the process of *in vitro* differentiation of *Leishmania donovani* using genomic microarrays. **Parasitology**, v. 134, pt. 11, p. 1527-39, 2007.

TYLER, K. M.; ENGMAN, D. M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. **International Journal of Parasitology**, v. 31, p. 472-81, 2001.

ANEXO

Listagem de genes trabalhados neste projeto e seus respectivos oligonucleotídeos iniciadores.

Nomenclatura	Gene	Tamanho	Primer F	Primer R
A02	Tc00.1047053509027.24	759	CACCATGTCCGTTGTGTTACCGC	TCATCGCAGCTCCGCGATTG
A03	Tc00.1047053510009.10	639	CACCATGATAAAAAATCCGCATTCT	CTACGGGCCCCACGAAACAG
A04	Tc00.1047053508625.140	825	CACCATGCGTACCAAGAGGAGGCT	CTATTCAATTCTGTGACGCT
A05	Tc00.1047053510303.204	1086	CACCATGACGCGACGTCCGAATC	CTAATTACAGATGTGCCAGG
A06	Tc00.1047053508737.40	942	CACCATGGAGCGGACGCGGGGGCT	TCAATTGCCTTCGGCCCCAT
A07	Tc00.1047053509643.110	1044	CACCATGAATCCAGACGCCAGC	TCAGTACAGATCGACCGGG
A09	Tc00.1047053505807.230	453	CACCATGAAATTCAGTGCAGAGA	TCACAAAACGACCCATGCGA
A10	Tc00.1047053506833.40	1071	CACCATGTGGGCAAGATTCTTC	CTATCGAGTTTGCAGCTCCC
A11	Tc00.1047053506195.180	804	CACCATGAAGTCCTTTTCTCAA	TCATTCCCTTTTCAGTTGAA
A12	Tc00.1047053503939.30	1158	CACCATGTCTTACACGCACTGCC	CTATTCCATTCTGCTTTTAC
B01	Tc00.1047053511727.280	765	CACCATGGGCTGAAAAGGCTTAG	TCAGAGGCAGTGTGTATGTA
B02	Tc00.1047053509831.30	540	CACCATGGCGGCTTTGGGAATACC	CTACATATTTTCTTCTTTC
B03	Tc00.1047053505943.30	1266	CACCATGCATGTGACCCGTTGCTC	TCATTCTCTTCTTCCGCAT
B04	Tc00.1047053503885.70	366	CACCATGGCGGCCCGTTGACGGC	TCATCGCGGTGACAATACTG
B05	Tc00.1047053506223.84	1044	CACCATGGAGAGCGGCAGGCAC	TCAGCGGCCCAATGTTGAG
C01	Tc00.1047053511367.90	1143	CACCATGAATCTTGAGCTCTGGC	CTACGACACGTAGAACACGC
C04	Tc00.1047053503647.40	1230	CACCATGCATCGAGGAGTGGATAC	TCAAGACTCAAAGATCGGAC
C06	Tc00.1047053509017.24	1530	CACCATGGTGAGAGCGAGGACTAT	CTAGACATGTCTACACCGCT
C07	Tc00.1047053506297.70	855	CACCATGCGGGGCGGCAATCCGC	TTACAAGGTGGAGTTCCTCA
C08	Tc00.1047053507047.50	1245	CACCATGTTTTAATTTTGCAAG	CTAGCCCCTACCTTGAGATG
C09	Tc00.1047053509791.100	1515	CACCATGGAGACGGATGCTGGCC	TTAGTCTTTTTGTGGTAATA
C10	Tc00.1047053503897.150	831	CACCATGGCATCCGTCGCTGGAGG	TCAATAAAATTGTTGGGGAG
C11	Tc00.1047053507625.170	1944	CACCATGACAACGAAAGATAAGAA	TTAAACATCAAAGCACGTA
C12	Tc00.1047053506733.130	2049	CACCATGAGCTCTAACTCTACGA	TCACAGCACCAGTAGATAGG
D05	Tc00.1047053503911.30	896	CACCATGCCACCACGACGATACTT	TCAAAGGTCGTACGCTGGT
D06	Tc00.1047053506893.100	786	CACCATGATCAACAGTGTGTACCA	CTAGAATTGGCGTAGTGCGG
D12	Tc00.1047053504077.30	471	CACCATGATGCGGAAGACGCCAT	CTAAACAACCTCTGGTCTAG
E02	Tc00.1047053507159.60	630	CACCATGTTCTCTTTTCTTCCG	CTAAGCACAGCACTGGAAGA
E03	Tc00.1047053508961.70	1119	CACCATGAACGGCGAGGTTTCGGT	TCAGACGGACGCCAGTGATC
E04	Tc00.1047053430895.10	780	CACCATGAGCAACTCCAATTTGA	TTAATTTCTGCTTATACATGAA
E05	Tc00.1047053506739.70	2265	CACCATGAACAGGAGAAACAAAGC	TCACACATCCCCAACGCC
E06	Tc00.1047053506009.50	1272	CACCATGCCAGGGTTTAGTCAGGG	TCAATCGCATCGTCACTAT
E09	Tc00.1047053506757.30	1380	CACCATGACATCATCTCCTATTGC	TTATTGTATTTTCAATTTGAA
E11	Tc00.1047053510531.100	3006	CACCATGTTTTAGCCATCGTCAA	CTATTGATTTCTCGTATCTG
E12	Tc00.1047053509895.60	777	CACCATGGGGAAGCTGCAGGTGTG	TCAATAATGGAAGTTGTGAT
F04	Tc00.1047053509139.10	1578	CACCATGTCTTCATCGATGAGGCG	CTACAAGTGAGCACGAAGTT
F06	Tc00.1047053509141.40	819	CACCATGCCGCCCATGCTCGCCGC	CTACGAGTGTGTGACGAGTA
F07	Tc00.1047053504057.97	1095	CACCATGAACCCGCGCTCGAAGTT	TCATCCCGACTCCATTGAAA
F08	Tc00.1047053508647.180	714	CACCATGGGGGGGTGCAAAAAGCA	TTAAATGTACTTACGTACCT
F09	Tc00.1047053506163.50	1191	CACCATGTCAAGGAATCTCGCT	TCAGTGCCTGGGTGTTGCTG
F10	Tc00.1047053509793.50	579	CACCATGATGCGTTTTACCCGGTT	TTAGGGGAGAGGCGGCACGG
F11	Tc00.1047053508823.20	390	CACCATGGCGAAGGTAAGGATAC	CTAGAAGCCTGCGAGGGCAA
G01	Tc00.1047053506605.214	573	CACCTGCCAAGCCCGCTAACCGT	CTAGCACGAGGACGCCACGC
G02	Tc00.1047053507491.20	1443	CACCATGCCATTTGCCTGGCAGAC	TCACCGCACAGCAGCACAGA
G03	Tc00.1047053507615.60	855	CACCATGGGTGATACGGAGCCTA	TCATTTGTGAGCTGAATGG
G05	Tc00.1047053507625.200	1068	CACCATGTGACGCGCGCATTGGC	TTAAGCTCCTTACTCCCTT
G06	Tc00.1047053506885.260	621	CACCATGCTCGACTACTTCGTCGC	TTAAGCTACCAATGACCATG
G08	Tc00.1047053506795.44	1776	CACCATGATGCGGTTGAGCAACCT	CTATTTTACGCTTTTTTCCA
G10	Tc00.1047053506945.260	1128	CACCATGGAATAACACGTCGGAA	TCAGACGCTTTTTCTCCAG
H01	Tc00.1047053511421.120	2169	CACCATGGATGGCGAAAGTAACGT	TTACTGCGAGATGAAGAGAG
H02	Tc00.1047053510039.80	1725	CACCATGGCGGGTCGCACCATAAC	CTACAAGTATGTGATGCCAG
H04	Tc00.1047053506155.40	1797	CACCATGACGAGGTATGTTCCGCC	CTAAATGTACTCCATCATGT
H07	Tc00.1047053418221.30	1299	CACCATGGCAGCCTCCGCTGCGGG	TCATTACGCGCCAACATCG
H08	Tc00.1047053449247.10	459	CACCATGGCTATTGTCGTATAAA	TTATTTTCTGGCGACGATG
H09	Tc00.1047053510533.170	1515	CACCATGTTCTATACGAGCTGCAG	TCAAGCATTCCTCATCTCA
H11	Tc00.1047053509023.80	1161	CACCATGTGCATCCTGGCCTTTGT	TCATATAATCGACCGTGATT
H12	Tc00.1047053507757.30	1050	CACCATGGGGGAAGAAAGTCATCT	TTAAAAACATGACGACATA

Nota: **Nomenclatura** corresponde ao nome interno, **Gene** corresponde ao nome registrado no banco de dados <http://www.genedb.org>. **Tamanho** está exibido em pares de bases, do ATG inicial ao códon de término, que corresponde ao tamanho do amplicon.